

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Parasitología



**MEDICINA REGENERATIVA:
CÉLULAS MADRE COMO NUEVA TERAPIA
BIOLÓGICA APLICADA EN EL TRANSPORTE
OSTEOCONDRA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

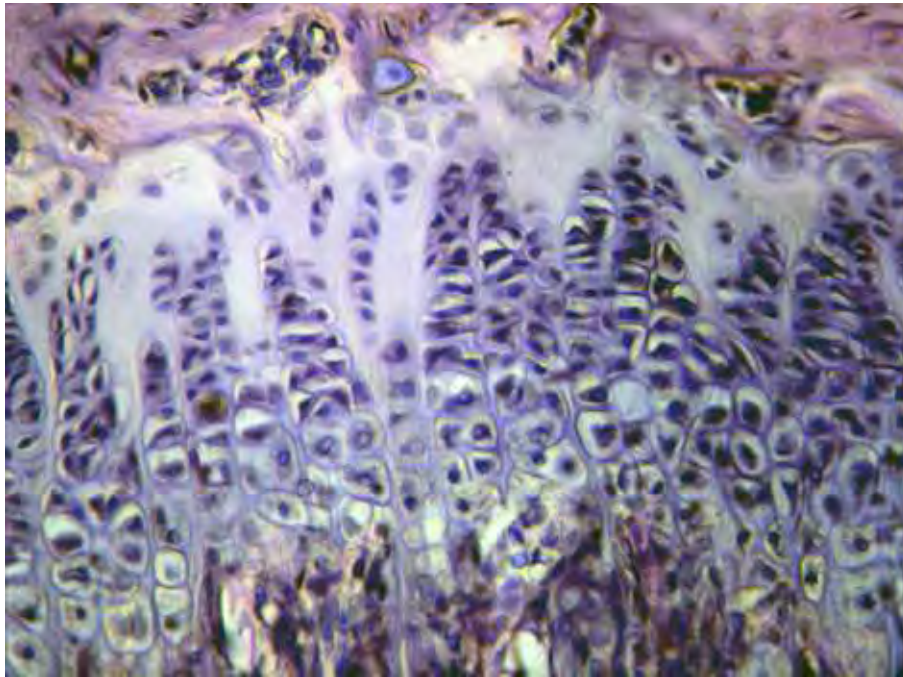
Ana María Escario García-Trevijano

Bajo la dirección del doctor
Emilio Delgado Baeza

Madrid, 2008

- **ISBN:**

MEDICINA REGENERATIVA:



CÉLULAS MADRE COMO NUEVA TERAPIA BIOLÓGICA APLICADA EN EL TRASPLANTE OSTEOCONDRA

ANA ESCARIO



Tesis doctoral. Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
Madrid, 2008

Copyright © A. Escario, 2008.



Medicina Regenerativa:

Células madre como nueva terapia biológica aplicada en el trasplante osteocondral

Tesis Doctoral

Ana María Escario García-Trevijano

2008

Director: Dr. D. Emilio Delgado Baeza

Ponente: Prof. Dr. D. Jose Antonio Escario García-Trevijano



Facultad de Medicina
Departamento de Histología

EMILIO DELGADO BAEZA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA

FACULTAD DE MEDICINA. HISTOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA,
HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA. HOSPITAL LA PAZ

CERTIFICA QUE:

El trabajo titulado: “**MEDICINA REGENERATIVA: CÉLULAS MADRE COMO NUEVA TERAPIA BIOLÓGICA APLICADA EN EL TRASPLANTE OSTEOCONDRA**”, presentado por D^a Ana María Escario García-Trevijano ha sido realizado bajo mi dirección y considero que reúne las condiciones para ser leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a efectos académicos, firmo el presente
CERTIFICADO en Madrid a 24 de marzo de 2008

Emilio Delgado Baeza



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia - Departamento de Parasitología

Comisión de Doctorado

Universidad Complutense de Madrid

INFORME DEL PONENTE DEL TRABAJO

“MEDICINA REGENERATIVA: CÉLULAS MADRE COMO NUEVA TERAPIA BIOLÓGICA APLICADA EN EL TRASPLANTE OSTEOCONDRALE”,

El trabajo “ Medicina Regenerativa: células madre como nueva terapia biológica aplicada en el trasplante osteocondral”, presentado por D^a Ana María Escario García-Trevijano y dirigido por el Dr. D. Emilio Delgado Baeza, para optar al grado de Doctor en Farmacia cumple los requisitos investigadores y originalidad que prescribe la legislación vigente, está realizado de acuerdo con una metodología adecuada y llega a unas conclusiones acorde con los objetivos planteados.

Por todo ello consideramos que tiene la categoría científica suficiente para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid 24 de marzo de 2008

Firma: Prof. Dr. D. José- Antonio Escario García Trevijano

Profesor Titular de Parasitología

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda del Fondo de
Investigaciones Sanitarias, proyecto PI/070499

En la Tesis Doctoral, de forma habitual, el agradecimiento es un apartado que corresponde al autor., sin embargo, siempre he pensado que la persona que también tiene que dar las gracias es el que dirige el Proyecto de Tesis. Dada la circunstancia de que esta sea una de las últimas tesis que dirija quiero dar las gracias. Es de agradecer que haya dedicado unos años de su vida, ¡y qué años!, a realizar el trabajo diseñado en mi laboratorio, participando en una línea de investigación que viene de años atrás y continuará en el futuro, si Dios quiere. Quiero agradecer su capacidad de soportar a este entusiasta aprendiz, director de su proyecto, así como soportar las grandes limitaciones del laboratorio. Quiero finalmente agradecer la oportunidad de aprender con ella. Gracias Ana.

Emilio Delgado Baeza

Los agradecimiento, una pagina difícil de escribir, la forma convencional de tono institucional y académico resulta una relación de nombres un tanto fría, con un sabor a despedida y yo lo que quiero agradecer es la oportunidad que me han dado de conocerles. Quiero agradecer a Javier Palacin el acierto de presentarme al grupo; a Predes Garcia Ruiz, ante todo una amiga, su generosidad sin limites para marcar el camino y recordar que el desaliento no forma parte del vocabulario científico; a Javier Regadera el “examen de ingreso” en la antesala de Emilio Delgado Baeza. Emilio es no solo el director del trabajo, sino también el amigo, el terapeuta, el técnico y el entusiasta del equipo no importa como llegues a “Jarvard” siempre saldrás optimista. Predes y Emilio me han enseñado todo, la célula, el hueso, un mundo al que solo he conseguido asomarme; al resto de compañeros de laboratorio Antonia Martos, Fernando, Begoña, Chus, el haberme enseñado prácticamente lo que es un verdadero trabajo en equipo.

También quiero agradecer al Gabinete de Veterinaria y Laboratorio de Patología Animal de la UAM con Carmina Fernandez Criado al frente de todo su equipo, David, Elis, Manolo, Miguel y Santi, todos los recursos técnicos y humanos que han puesto a nuestra disposición para el desarrollo de este trabajo. Asi como a D^a Pilar Barredo Sobrino, Directora de la Biblioteca de Medicina, UAM y D^a Mercedes Echevarría Morrás, Bibliotecaria de la Fac. de Medicina de la UAM, agradecerles su colaboración. A Antonio, Chema y Jaime, su servicio informático “on home” y su ayuda en la vertiente mas personal.

A todos gracias por su amistad y apoyo en momentos buenos y menos buenos y sobre todo decirles lo bien que me lo he pasado haciendo este trabajo.

Ana Escario

Índice

1 Introducción	1
1.1 Células troncales o células madre	2
1.1.1 Fuente de células troncales mesenquimales	3
1.1.2 Características de las células troncales	4
1.1.3 Autorenovación, mantenimiento y numero de las MSCs	6
1.1.4 Nichos de las MSCs	7
1.1.5 Aplicación de las células troncales en medicina reparativa e ingeniería tisular	12
1.2 Biología de la placa de crecimiento	14
1.2.1 Histología de la placa de crecimiento	15
1.2.2 Función y regulación de la placa	18
1.3 Clínica del trasplante de placa	22
1.4 Justificación del proyecto de estudio	24
2 Hipótesis	27
3 Planteamiento	29
4 Material y Métodos	35
4.1 Materiales y reactivos	35
4.1.1 Animales	35
4.1.2 Aparatos	37
4.1.3 Materiales	38
4.1.4 Medios de cultivo	38
4.1.5 Soluciones y reactivos	39
4.2 Métodos	41
4.2.1 Animales: anestesia, tratamiento, eutanasia,	41
4.2.2 Método de extracción de células y cultivos	42
4.2.3 Métodos de estudio histológico	44
4.2.4 Valoración por transiluminación “ex vivo”	46
4.2.5 Cultivo de placa de crecimiento “in vitro”	47
4.2.6 Injerto de placa de crecimiento en cápsula renal	49
4.2.7 Resección de zonas e interposición de membrana	49
4.2.8 Trasplante alogénico ortotópico avascular de placa de crecimiento	51
4.2.9 Estudio Radiológico	54
4.2.10 Estudio Histológico	57
5 Resultados	59
5.1 Resultados técnica de transiluminación	59

5.1.1 Valoración de la placa de crecimiento.....	59
5.1.2 Valoración de la muerte celular.....	64
5.2 Resultados cultivo placa “in vitro”.....	66
5.2.1 Controles en fresco previos al cultivo.....	66
5.2.2 Cultivo en medio DMEM-INS-TGF.....	67
5.2.3 Cultivo en medio DMEN-INS.....	70
5.2.4 Histología de las piezas sin cultivo.....	75
5.2.5 Análisis de los resultados del cultivo “in vitro”.....	76
5.3 Resultados injerto en cápsula renal.....	78
5.3.1 Valoración del injerto en cápsula renal.....	82
5.4 Resultados resección de zonas e interposición de membrana.....	82
5.4.1 Valoración resección de zona e interposición de membrana.....	84
5.5 Resultados estudio radiológico.....	85
5.5.1 Serie EC sin terapia celular.....	86
5.5.2 Serie E0. Con células MSC.....	104
5.5.3 Serie E15. Con células MSC.....	124
5.5.4 Serie JC sin terapia celular.....	143
5.5.5 Serie J15. Con MSC.....	154
5.5.6 Resumen del estudio radiológico.....	167
5.6 Resultados estudio histológico.....	171
5.6.1 Serie EC sin terapia celular.....	171
5.6.2 Serie E0, tratamiento con MSCs.....	176
5.6.3 Análisis detallado del Grupo E0.2.....	182
5.6.4 Serie E15. Tratamiento con MSCs.....	190
5.6.5 Serie JC sin terapia celular.....	194
5.6.6 Serie J15. Tratamiento con MSCs.....	197
5.6.7 Resumen del estudio histológico.....	203
6 Discusión.....	205
Técnica de transiluminación.....	205
Relación entre zona germinativa y zona proliferativa.....	207
Trasplante osteocondral.....	209
Análisis Radiológico.....	211
Análisis Histológico.....	212
Casos especiales.....	216
7 Conclusiones.....	225
8 Resumen.....	227
9 Bibliografía.....	229

Abreviaturas

3G5: anti-ganglioside monoclonal antibody
ADSC: adipose-derived stem cell
BMP: bone morphogenetic protein
BrdU: bromo-dioxyurina
C/EBP: CCAAT/*enhancer-binding protein*
Cbfa: core binding factor alpha 1
CFU-F: clonogenic fibroblast precursor cells, or, colony forming unit-fibroblast.
CHOP: C/EBP-*homologous protein*
COS: centro de osificación secundario
EC: microvascular endothelial cell
ECM: extracellular matrix
EGF: epidermal growth factor
FBS: foetal blood serum
FGF: fibroblas growth factor
FNT: factor necrosis tumour
GBSS: Gey's Balanced Salt Solution
H&E: hematoxilina & eosina
HGF: hepatocyte growth factor
HIF-2alfa: hypoxia-induced factor.
HSC: hematopoietic stem cell
IGF: insulin growth factor
Ihh: Indian hedgehog
IL: Interleukin
LIF: leukemia inhibitor factor
MARK: mitogen-activated protein kinase
MSC: mesenchymal stem cell. Células mesenquimales del adulto

N-CAM: neural cell adhesion molecule

NO: nitric oxid

Oct-4: Octamer-4, a member of the POU family

PDGF: platelet-derived growth factor.

PLA: polymers poly-L-lactide

PLGA: poly-L-lactide-co-glycolide

PTHrP: Parathyroid hormone-related peptide

Runx: runt-related transcriptional factor

Sox: a multi-gene family that encode proteins

SP: side (or, aside)-population cell

TGF- β : transforming growth factor beta. Factor beta transformante de crecimiento

VCAM(= CD 106): vascular cell adhesion molecule-1.

VEGF: vascular endothelial growth factor

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor.

WISP: Wnt-1 inducible protein.

Wnt: mammalian homologue of *Drosophila* wigless.

α -SMA: α -smooth muscle actin

1 Introducción

El devenir de mi vida profesional como farmacéutica me ha llevado por distintos caminos. Estos se iniciaron en el campo del control de calidad, la parasitología y la microbiología hasta arribar ,“*nel mezzo del cammin di nostra vita* ”, al excitante campo de la biología de la célula, presentando un trabajo interdisciplinar de Farmacia y Medicina.

La farmacología ha tratado de aliviar el dolor mediante la aplicación de multitud de preparados y drogas y en la actualidad de cuidar de la salud, de proporcionar lo que denominamos calidad de vida. Desde su periodos iniciales, tablillas sumerias de Nippur (Mesopotamia, tercer milenio a.c.) hasta Galeno (130-200 a.c.) se preocupa fundamentalmente de quitar el dolor. A partir de Maimónides (1135-1204) y Paracelso (1493-1551) se instaura la administración de drogas. En 1739, surge la primera Farmacopea Oficial española. A partir de Claude Bernard (1813-1878), se inicia un nuevo periodo, en el que se instaura el estudio experimental. A este periodo, que parte de la fisiología, se le irán sumando prácticamente todas las áreas de conocimiento básico (química, bioquímica, microbiología, etc). Aparecen los problemas de los denominados efectos secundarios de la medicación y con ellos surge la farmacodinamia y la farmacocinética, así como el control de calidad en la preparación de los elementos terapéuticos que se instauran. Esto se hace más necesario en la actualidad a partir de la irrupción de la Biología Molecular y los avances en terapia génica y celular, técnicas de aplicación excepcional, y no exentas de graves complicaciones no siempre conocidas. Campos, todos ello, de grave responsabilidad. Así pues, la farmacología está llamada a jugar un papel importante en el campo de la biotecnología.

En farmacología se abre así un nuevo campo de estudio. Uno, de forma particular, hace referencia al uso actual de las células troncales, traducidas al español por células madre.

La médula ósea del adulto contiene unas células progenitoras multipotentes, que se definen por Caplan como células troncales mesenquimales (MSCs). Estas células tienen dos capacidades: Primera, se pueden diferenciar en distintos tipos de células en su estadio final, como por ejemplo hueso, cartílago. Por ello, estas células se pueden usar para reparar otros tejidos. Segundo, las MSC segregan un amplio espectro de macromoléculas bioactivas que sirven tanto como inmunoreguladoras como regeneradoras de microambientes en campos donde el tejido esta lesionado. La capacidad de las MSCs de anidar en un foco de lesión, o de participar en la respuesta a una lesión mediante factores paracrinos, así como por medio de “factores tróficos” define el concepto de Medicina Regenerativa (Caplan 2007)

Introducción

En este trabajo propongo una aproximación al estudio de las células troncales y sus efectos sobre un modelo experimental de trasplante de placa de crecimiento. Con el estudio de las células troncales se trata de estudiar la funcionalidad de los biofactores que se producen. Con el modelo experimental de trasplante de placa de crecimiento se trata de aproximar el estudio a los efectos de las células troncales sobre la placa.

El trasplante de placa de crecimiento aún no se realiza en clínica humana actualmente. Las técnicas modernas de cirugía ortopédica permiten, en situaciones de tumores malignos de origen osteocondral, reseca el hueso y realizar un trasplante óseo; sin embargo, estos huesos se encuentran carentes de placa de crecimiento, por lo que el hueso no crece con las consecuencias que le sigue. Una de estas consecuencias es que, en pacientes jóvenes a los que se les realiza un trasplante de hueso, tras una resección tumoral, este no crece y cursa con importantes acortamientos.

El objetivo del proyecto es estudiar la aplicabilidad de células troncales en el trasplante de placa de crecimiento, con carácter de estudio preliminar. Las limitaciones de este estudio son muy numerosas, y demasiados aspectos del trabajo (referentes a morfología, inmunología, biología molecular, etc.) quedan fuera del alcance del presente trabajo.

1.1 Células troncales o células madre

La transición y los cambios morfológicos y de función observados desde la fertilización del huevo por el espermatozoide hasta el nacimiento del organismo individual es un proceso exquisitamente controlado de cambios secuenciales. Este proceso de desarrollo está genéticamente controlado y conduce a tejidos y órganos con una precisa integración morfológica y funcional. La clave de este proceso es la conversión de grupos de células multipotentes a células diferenciadas y altamente especializadas, estrechamente ligadas a la función del tejido (Caplan 2007)

Los estudios iniciales de Friedenstein (1980, 1990) y Owen (1985, 1988) establecen que la médula ósea contiene células que pueden dar lugar a un amplio espectro de tejido conectivo plenamente diferenciado. La aplicación experimental y clínica de estas células ha expandido el campo de la Medicina Regenerativa y de la Bioingeniería (Caplan, 2007). A partir de entonces se han buscado zonas en el adulto donde se localizan estas células. En un principio, estas células sin especialidad conocida son consideradas quiescentes, pero capaces de renovarse; su división asimétrica produce una célula troncal idéntica y una segunda progenitora encomendada de dar lugar a una línea celular específica con una diferenciación

programada (Aggarwal et al 2005). Estas células permanecen en un estado indiferenciado por la supresión por factores intrínsecos o extrínsecos, hasta que son estimuladas.

Las células troncales del adulto se han descubierto y caracterizado en múltiples tejidos, lo que ha sugerido su potencial aplicación terapéutica en los tejidos del propio huésped (Wynter et al 1999, Dua et al 2000, Rao 1999). Como estas células son capaces de diferenciarse en líneas celulares específicas cuando son necesarias, la posibilidad de realizar implantes autólogos en clínica o mediante bioingeniería genética, producir proteínas o drogas sin riesgo de rechazo inmunológico se ha visto como una posibilidad. Sin embargo, el éxito de la aplicación futura depende de la comprensión del comportamiento biológico de estas células. Los resultados aportados en la actualidad sugieren que las células troncales hematopoyéticas de la médula ósea pueden mostrar un fenotipo hepático (Lagasse et al 2000, Petersen et al 1999, Alison et al 2000); que las células satélites del músculo muestran capacidad hematopoyética (Jackson et al 1999) y que las células troncales mesenquimales de la médula ósea pueden diferenciarse en músculo esquelético (Ferrari et al 1998)

Aspectos generales de las células troncales referentes a las células troncales embrionarias (Tuan et al 2002-3, Yamanaka et al. 2007), células troncales como origen del cáncer (Tuan et al 2002, Alison et al 2007), así como otros aspectos no son revisados en la presente introducción.

1.1.1 Fuente de células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales del adulto (MSC) que tienen la capacidad de diferenciarse en condrocitos, osteoblastos, adipocitos, fibroblastos, estroma médula y otras células mesenquimales residen en distintos tejidos del adulto, tales como el periosteó, tejido adiposo, membrana sinovial, músculo, dermis, médula ósea, e incluso en la trabécula ósea (Tuan et al 2002). Normalmente, la médula ósea se considera la fuente más accesible y rica en células MSC. (Fig 1.1.1)

La médula ósea contiene tres tipos celulares: células endoteliales, células troncales hematopoyéticas, y células estromales. (Friedenstein et al 1976), aislaron células, células clonogénicas precursoras de fibroblastos (CFU-F), de médula ósea y observaron que eran capaces de formar colonias, capaces de formar hueso y cartílago. Estudios posteriores se han interesado no solo en el potencial de diferenciación de las células MSC, sino de los mecanismos que regulan esta diferenciación específica hacia una línea celular, particularmente hacia hueso y cartílago. (Pittenger et al 1999) mostraron que las células aisladas por aspiración de la médula ósea humana eran capaces de permanecer en un estado de no diferenciación cuando se cultivaban *in vitro* durante largos periodos de tiempo, y que las colonias aisladas de una simple célula podían ser inducidas a diferenciarse en líneas de células

osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas, cuando se las colocaba en un medio adecuado. A partir de entonces surgen trabajos con métodos de aislamiento celular y preparación de medios más homogéneos con la posibilidad de clonar células procedente de colonias MSC. (Kurnetsov et al 1997) mostraron que la población de células estromales, cultivadas en medio con suero, eran capaces de formar colonias en respuesta a factores como: factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor beta transformante de crecimiento (TGF-beta), factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico.

Células mesenquimales de la médula ósea

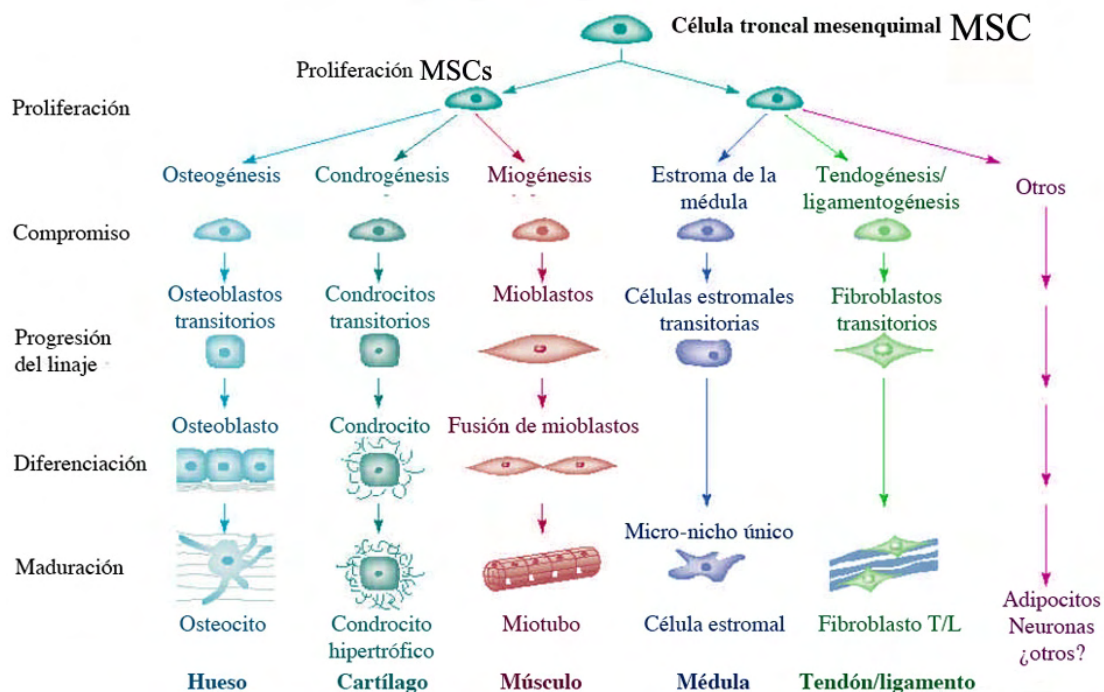


Imagen 1.1.1. Potencialidad de diferenciación de las células mesenquimales

1.1.2 Características de las células troncales

La MSCs se describen como células multipotenciales por su capacidad, aún como células clones de células aisladas, para diferenciarse en una variedad de líneas celulares y tejidos. Sin embargo, en muchos estudios, queda por demostrar cuando una verdadera célula

troncal está presente o cuando la población celular está compuesta realmente por una mezcla de células progenitoras de distintas líneas específicas. Eso no se aprecia o se define en las distintas publicaciones. En la actualidad, no hay un criterio de definición de los distintos marcadores que definan un tipo característico de MSCs (Tuan et al 2002).

Algunos grupos han usado el término “célula estromal de la médula” intercambiable con “célula troncal mesenquimal” (Prockop 1997). Cuando en realidad estos dos tipos de células tienen una ascendencia común, la característica estromal se puede pensar como una línea ya definida con un potencial limitado de diferenciación. La diferencia morfológica entre ambas es su aspecto fenotípico como fibroblastos, encontrándose más diferenciadas esta últimas. La primeras en algunos momentos pueden recordar líneas hematopoyéticas. (Tuan et al 2002)

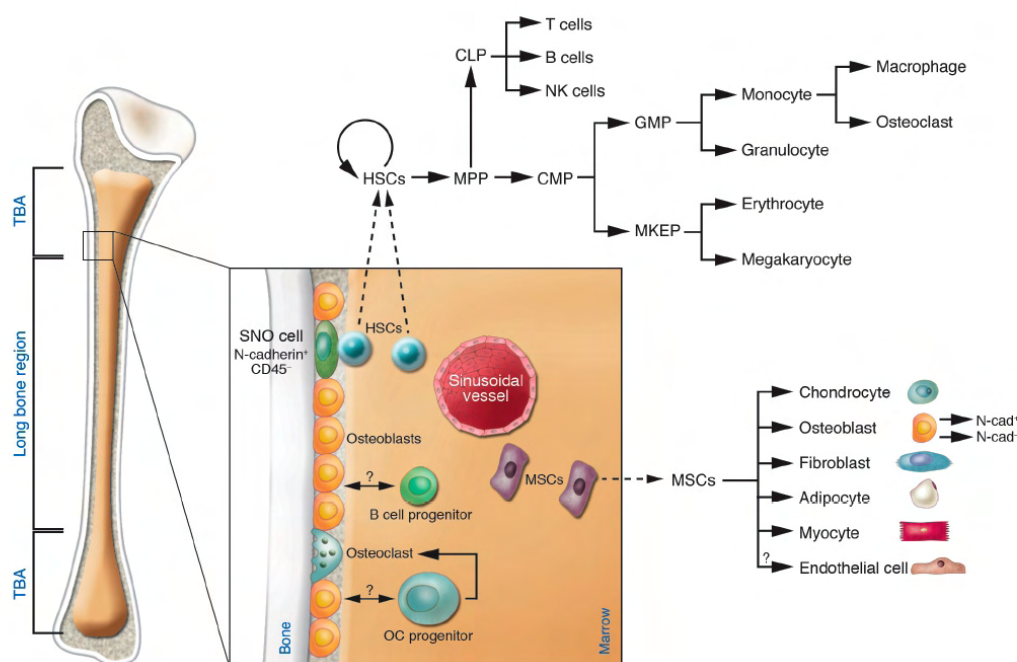


Imagen 1.1.2. Células troncales hematopoyéticas (HSCs) y células troncales mesenquimales (MSCs) (Yin et al 2006)

Aunque las MSCs se encuentran presentes durante toda la vida, su número total está inversamente correlacionado con la edad del paciente y dependen también del lugar de extracción y del estado clínico del paciente (Majors et al 1997)). Aunque se han definido las características de la cinética de la curva de crecimiento y el potencial de diferenciación osteogénica a largo plazo de las MSCs (Bruder et al 1997), se ha observado que la población de MSCs immortalizadas están compuestas de una combinación heterogénea de células progenitoras uni-bi-tri-potenciales (Okamoto et al 2002).

Las MSCs aisladas directamente de la médula ósea son positivas a CD34, y aunque

Introducción

sirven como un antígeno marcador para una inmunoselección positiva de las células troncales hematopoyéticas, este marcador se pierde en los cultivos *in vitro*. El marcador más persistente para las células hematopoyéticas es CD50 (Waller et al 1995). El aislamiento y enriquecimiento de la población MSCs se ha facilitado por el anticuerpo monoclonal Stro-1 (Simmons et al 1994). Los marcadores más recomendados son Stro-1, CD73 y CD106 o VCAM-1 (Kolf et al 2007).

En nuestro laboratorio hemos observado que las células hMSCs aisladas de la médula ósea humana son o llegan a ser células progenitoras en cultivos. En ausencia de FBS y en presencia de insulina o prolactina, las células muestran organización citoesquelética y un lugar de transcripción AP-1 que recuerda los condrocitos, mientras que las células en presencia de dexametasona y con adición de prolactina o TGF- β recuerdan a los osteoblastos diferenciados (Romero-Prado et al 2006).

1.1.3 Autorenovación, mantenimiento y número de las MSCs

El proceso de autorenovación se refiere a la ruta biológica y mecanismos que preservan las células troncales indiferenciadas. Todo el aparato genómico ha sido usado para identificar las posibles moléculas que mantienen el estado de las células troncales, incluyendo las MSCs (Ito et al 2001). Entre los factores que se han definido como posibles se encuentran: LIF, EGF, HGF, PDGF, CFU-F (Kolf et al 2007). En la autorenovación de las MSCs participa Wnt y esta a su vez depende del entorno tanto para renovarse como para diferenciarse (Kleber et al 2004).

El proceso de envejecimiento ocurre por una serie de cambios regulados por la información genética del organismo. Los cambios fenotípicos producidos en una célula progenitora en una secuencia de transición del desarrollo dependiente del tiempo define su línea celular. Una vez que la célula muere, es reemplazada por una segunda célula. De esta forma todos los animales permanecen en su estado vital y constantemente rejuvenecen sus tejidos. Esta secuencia de recambio requiere, en el adulto, la existencia de células progenitoras con posibilidad de madurar en varios fenotipos celulares. Esta célula progenitora se denomina célula troncal del adulto con la función de renovar las células que normalmente mueren. Estos cambios a través de la edad es lo que se denomina envejecimiento. Por ejemplo, en el adulto las MSCs son responsables de la sustitución de los osteoblastos que tienen una vida media de 8-10 días en el humano (Caplan 2007). En qué medida la desregulación génica que aparece en las células envejecidas es causa o efecto del envejecimiento se desconoce (Dykstra et al 2008).

Número de MSCs. Se ha observado que el número y el potencial proliferativo de las rMSCs declinan con la edad en las ratas y esto se manifiesta por la menor capacidad en

producir un número de osteoblastos así como en la función de los mismos (Bergman et al 1996). La capacidad de las MSCs, extraída de cultivo de médula ósea, de diferenciarse en cartílago y hueso es independiente de la edad del donante (Caplan 2007), aunque los títulos de MSCs cambian con la edad (Haynesworth et al 1994). Los título de MSCs de médula ósea humana tomados por el número de colonias formadoras de unidades de fibroblastos (CFU-f), son máximas en el recién nacido (1/10.000), descienden en los jóvenes (1/100.000) y decrecen a los 30 años (1/250.000), 50 años (1/400.000), y disminuyen en gran cantidad a los 80 años (1/2.000.000) (Caplan 2007). Qué controla los títulos de MSCs en médula ósea humana y porqué cambian con la edad aún no se conocen

Migración de las MSCs. Este aspecto aún es objeto de estudio, aunque se ha descrito en las HSC (Wright et al 2001).

1.1.4 Nichos de las MSCs

El concepto de “nicho” de células troncales fue introducido por primera vez por Schofield en 1978 (Schofield 1978), la idea ha ido ganando adeptos, particularmente en los años recientes. El nicho comprende todo los elementos que rodean a la célula troncal cuando se encuentra en su estado nativo, incluyendo las células no troncales que puedan estar en contacto directo con ellas así como la ECM y las moléculas solubles que se encuentran localmente. Todos ellos actúan de forma conjunta para mantener las células troncales en su estado de indiferenciación. Esto sugiere que de alguna forma se puede influir o actuar en el nicho para dar una señal a las células troncales para que estas inicien el proceso de regeneración o repoblación del tejido (Kolf et al 2007). En el nicho hay que distinguir tres componentes: 1º, Componente celular; 2º, componente soluble; y 3º, componente de matriz extracelular.

1º Componentes celulares del nicho

Los estudios recientes sugieren la naturaleza perivascular del nicho en las MSCs, basándose en la expresión de α -SMA en las MSCs aisladas de tejidos (da Silva et al 2006) y en la localización inmunohistoquímica de células CD45/CD31/Sca-1⁺/Thy-1⁺ de localización perivascular. Las MSCs se encontraron, usando marcadores Stro-1 y CD 146, próximos o bordeando los vasos sanguíneos en médula ósea humana (Shi et al 2003). Estas células también expresan α -SMA y 3G5, un marcador de superficie celular asociado a pericitos. Algunos autores han mostrado que son de hecho MSCs, porque pueden diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Doherty et al 1999). Proteínas de adhesión celular transmembrana, cadherinas, funcionan en la unión célula-célula, migración, diferenciación y polaridad celular, incluyendo las MSCs (Tuli et al 2003), y se conoce que interactúan con Wnts, que son importantes en la biología de las MSCs (Nelson et al 2004)

Introducción

El concepto de nicho se ha extendido a otros tejidos. Las preparaciones de células troncales derivadas del tejido adiposo (ADSC) tanto del humano como de animales muestran una capacidad de diferenciación similar a la MSCs (Caplan 2007, Lee et al 2004, Katz et al 2005). Sin embargo la impresión es que estas células semejantes a las MSCs están asociadas a los vasos sanguíneos (Tavian et al 2005). Los estudios de Caplan (Caplan 2007) sugieren que hay gran correlación entre el título de las colonias CFU-f y la densidad vascular en todas las muestras de tejido adiposo estudiado. Esta correlación entre el patrón vascular y los títulos de MSCs ha sido puesta en evidencia por otros autores (Kubis et al 2006; Meirelles et al 2006). En médula ósea de mamíferos se han identificado pequeñas células troncales similares a las células del embrión (Kucia et al 2008). Zhang et al (2003) y Calvi et al (2003) han demostrado que el osteoblasto -célula que reside en la médula ósea y segrega la matriz del hueso calcificado- juega un papel crucial en la regulación del nicho de HSCs

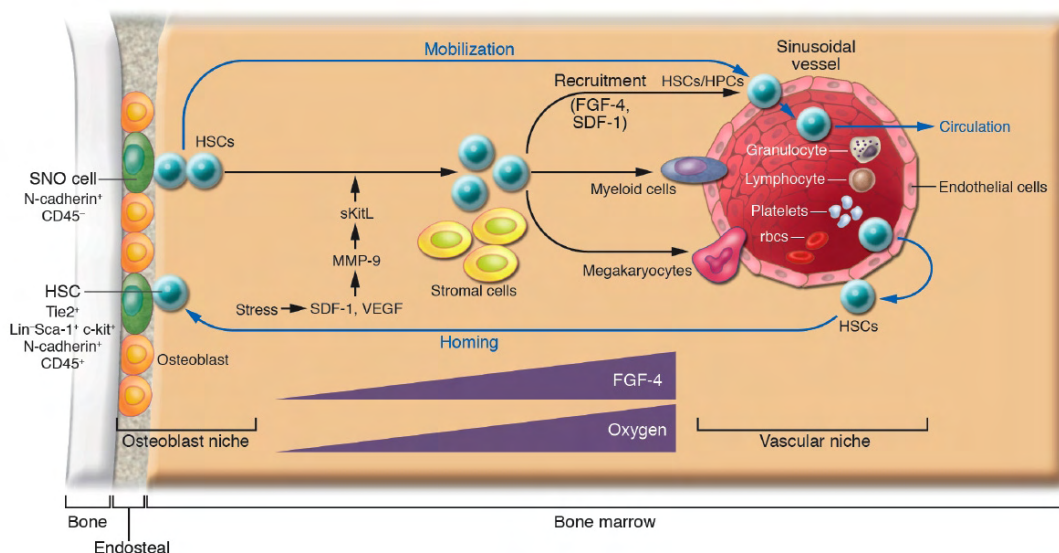


Imagen 1.1.3. Nicho osteoblástico y nicho vascular (Yin et al 2006)

Tipos de nichos según la celularidad.

El concepto de nicho hace referencia a la ubicación de un complejo estructural tisular microambiental con responsabilidad en la reconstitución de células con actividad funcional. Así pues, habrá tantos tipos de nichos según el tejido y órgano donde se sitúe. También se describen otros tipos de nichos (Kolf et al 2007): 1) **Nicho osteoblástico**, puesto que es claro que el osteoblasto es un componente crucial en el nicho de MSCs en la médula ósea del adulto, en el que las citoquinas, quimocinas y moléculas de adhesión juegan un papel importante. 2) **Nicho vascular**, este nicho se puede diferenciar en una parte embrionaria y en una parte adulta. En el nicho del adulto inter-actúan las HSCs y las células endoteliales, aspectos estudiados pero no muy bien comprendidos. Las células endoteliales de vasos

pequeños (EC) inducen la proliferación y diferenciación de células troncales del cordón umbilical, estas células expresan VEGF (Dominici et al 2001). 3) **Nicho de células progenitoras**, con importantes relaciones funcionales con las MSCs (Kolf et al 2007)

Aside cells o side-population (SP)-desconocemos la terminología española: Constituye un grupo poco conocido pero de gran importancia en el desarrollo. El “grupo de células aparte” (“*set-aside cells*”) hace referencia a un grupo de células que de alguna manera no participan en el proceso de diferenciación pero que en el embrión tardío genera la estructura de larva *per se*, en el caso de los metazoos. Las células serían consideradas como *set-aside* con respecto a su contexto en el desarrollo son utilizadas en los estadios tardíos al igual que ocurre en muchos organismos de metazoos. Ejemplo de ello son las células madre (stem cells) de los vertebrados adultos (Peterson et al.1997)

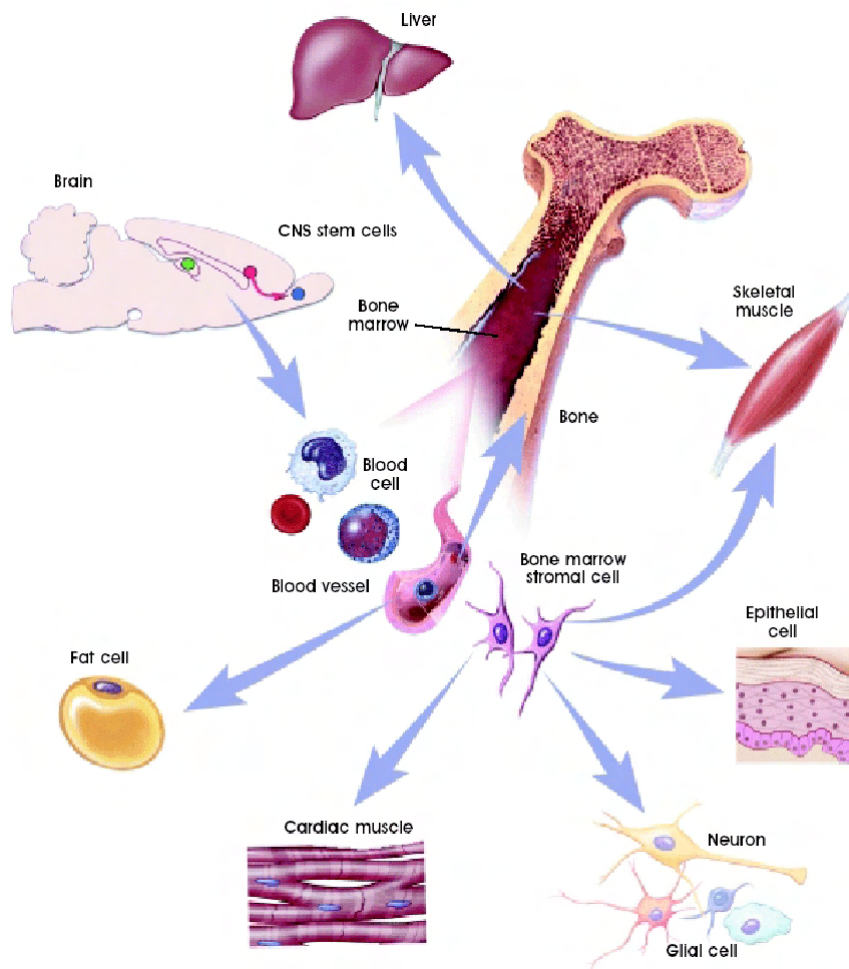


Imagen 1.1.4. Nichos de MSCs

Una propiedad común de las células troncales es la quiescencia con respecto al ciclo celular. Casi el 75% de las HSCs son quiescentes en la médula ósea (Cheshier et al 1999), de tal forma que si se bloquea el ciclo celular permanece la función de la célula troncal. Tratamientos contra el cáncer hacen que las células quiescentes entren en el ciclo celular

(Cheshier et al 1999). Las SP son una fracción de células que se tiñen poco con fluorescencia (Goodell et al 1996), que pueden funcionar como células troncales. Sin embargo, las células troncales no se han detectado en poblaciones de células SP (Suda et al 2005). En la actualidad las células SP son objeto de estudio. Sin una relación directa con la células SP, por la terminología, pero sí por la aproximación metodológica de estudio, es sugerente la aportación de Colter y cols (Colter et al. 2000); estos autores distinguen tres poblaciones de células pequeñas en los cultivos de médula ósea, pero por el momento no se pueden extraer más conclusiones.

Macrófagos. aunque derivan de células del sistema hematopoyético, los macrófagos son considerados como una parte del sistema de soporte del nicho porque producen muchos sistemas reguladores.

2º. Componentes solubles del nicho.

Que el medio, *milieu*, de la médula ósea es hipóxico es de una relevancia particular. La comparación de que las células MSCs cultivadas en condiciones de hipoxia *versus* de normoxia (2% y 20% de oxígeno) muestran que la capacidad proliferativa es mayor en la hipoxia (Grayson et al 2006). Los mecanismos de acción de la hipoxia en las MSCs es desconocido, aunque la sobreproducción de oct-4 por el factor de transcripción HIF-alfa es posible (Covello et al 2006). El papel de las proteínas segregadas en el nicho de MSCs se desconoce en la actualidad. No obstante se piensa que son para la comunicación celular y la regulación integrada del organismo, además de retener, por su gran tamaño, una gran cantidad de agua.

3º. Componentes de la matriz extracelular del nicho.

No se ha identificado en la actualidad componente alguno de la matriz extracelular del nicho que ayude a conocer el mantenimiento de las MSCs en su estado nativo y definir como debería de ser la matriz típica de un nicho. Los componentes de la matriz extracelular son el resultado de la expresión específica de las células del nicho. En la formación endocondral de hueso se produce gran cantidad de matriz extracelular con diferentes tipos de colágenos, mucopolisacáridos y glicoproteínas que estructuran la formación de hidroxiapatita, dan elasticidad y mantienen la comunicación celular.

Anidamiento en el lugar de lesión (*homing*) de las MSC y cicatrización.

Otro fenómeno relacionado con el nicho de las células troncales es el anidamiento de

las células troncales en el lugar de la lesión, *homing*, y la subsecuente reparación de la lesión. Aunque la reparación de algunos tejidos se acompaña de la división de células diferenciadas del propio tejido, tales células se encuentran frecuentemente en un estado post-mitótico. De esta forma, se requiere el envío de señales a las células troncales o progenitoras para habitar o anidar el lugar de la lesión y diferenciarse en el tipo de células necesarias. Aún en tejidos sanos, las MSCs son capaces de anidar en otros tejidos además de la médula ósea, tales como el pulmón o los músculos (Francois et al 2006). La capacidad de una MSC para anidar parece que está relacionada en parte con su expresión de Stro-1 (Bensidhoum et al 2004). Referente a la migración de las MSCs, se ha observado que, en estudios *in vitro*, la migración de MSCs está regulada por el factor-1/CXCR4 derivado del estroma y por el complejo factor de crecimiento hepatocítico/c-Met, y que también implica las metaloproteinasas de la matriz (Son et al 2006).

Además, parece que las células maduras que han sido lesionadas son capaces de segregar no solo señales de anidamiento sino también señales de diferenciación. Las MSCs derivadas de la médula ósea de la rata, inician la miogénesis en respuesta a un medio condicionado por daño muscular previo pero no a un medio de un músculo no lesionado (Santa Maria et al 2004)

Función de las MSCs.

En cualquier revisión bibliográfica realizada que estudie la aplicación de las células MSCs, se puede observar que los resultados se han valorado en función de una actividad de plasticidad. Es decir, a las células MSCs se le ha aplicado una función plástica aún careciendo de estudios rigurosos que lo certifiquen. (Caplan y Dennis 2006), tras estudiar diferentes resultados de la aplicación clínica de MSCs en infartos cerebrales, lesiones cardíacas y lesiones meniscales, no evidencian una función de plasticidad de estas células, sino una función trófica. La función trófica de las células MSCs está en función de los biofactores que producen estas células. Sus resultados concluyen: Las células MSCs dan lugar en el sitio de la lesión a una aumento de la fibrosis y apoptosis local, promueven la angiogénesis y estimulan a las células progenitoras del huésped a dividirse y diferenciarse en unidades regenerativas.

Inmunoregulación.

Cuando el medio en el que han crecido las MSCs ha sido objeto de estudio se ha observado con varios inmuno-análisis que tienen un fuerte efecto inmunosupresivo (Pittinger et al 1999, Devine et al 2001, Beyth et al 2005). Aunque los efectos inmunomoduladores de los factores bioactivos segregados por las MSCs no han sido aún descritos, los datos sugieren que las MSCs pueden usarse en trasplantes alogénicos (Caplan, 2007)

1.1.5 Aplicación de las células troncales en medicina reparativa e ingeniería tisular

En la actualidad el estudio de investigación y aplicación de las MSCs abarca en la práctica todos los tejidos y todos los órganos del cuerpo humano. Para la finalidad de nuestro proyecto nos hemos centrado en un somero análisis referido al hueso y al cartílago.

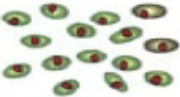
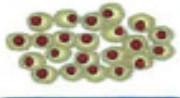
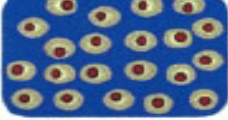
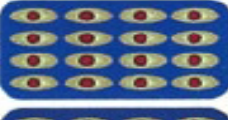
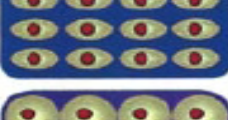


Mecanismos de regulación de la diferenciación osteo-condrogénica.

La inducción de osteogénesis por MSCs es un proceso altamente programado, y se ilustra mejor en los estudios *in vitro*. El tratamiento con dexametasona estimula la proliferación de MSCs y el soporte de la diferenciación osteocondral (Bellows et al 1990, Liu et al 2002), aunque esta no siempre es necesaria (Johnstone et al 1998). Los fosfatos orgánicos, tales como el β -glicerofosfato, también favorecen la osteogénesis jugando un papel en la mineralización y modulación de la actividad osteoblástica (Chung et al 1992, Tenenbaum et al 1992). Los fosfatos libres pueden inducir la expresión de mRNA y de proteínas de los marcadores osteogénicos como la osteopontina, y estos fosfatos tienen un efecto conocido en la producción y exportación nuclear de un gen regulador de la osteogénesis, Cbfa1 (Beck et al 2000, Fujita et al 2001, Ducy et al 1997). Otros suplementos tales como ácido ascórbico, glicerol fosfato y 1,25-dihidroxivitamina D3, se usan de forma corriente en la inducción de osteogénesis, la última da lugar de la actividad de la fosfatasa alcalina y promueve la formación de osteocalcina (Liu et al 1999). Los miembros de la proteína morfogenética del hueso (BMP) se usan también como factores de osteoinducción (Hanada et al 1997).

Regulación molecular de la diferenciación condrogénica.

La inducción de condrogénesis por medio de las MSCs depende de la coordinación de muchos factores, en los que se incluyen parámetros tales como densidad celular, factores de adhesión y factores de crecimiento. Así, en condiciones de cultivo de MSC dirigidos hacia la inducción de condrogénesis requiere un precipitado de alta densidad y crecimiento en un medio libre de suero que contenga factores de crecimiento y suplementos. Las proteínas de la superfamilia de TGF- β y sus miembros como las BMPs, son factores reconocidos como necesarios en la inducción de condrogénesis (El-Amin et al 2002, MacKay et al 1998). De igual forma los miembros de la familia Wnt (Rudnicki et al 1997, Tufan et al 2001); WISP relacionada con la misma familia de proteínas considerada como un factor de crecimiento del tejido conectivo, que es regulada por Wnt (Grotendorst et al 1997). Otra cascada de señales que participan en las señales de TGF- β incluye la vía de la proteína kinasa mitogénica activada (MARK), que participa en la vía TGF- β 1 y BMP-2. Las señales intracelulares iniciadas por TGF- β están mediadas por la familia Smads (Heldin et al 1997, Massague 1998).

Tabla 1.1.1.Regulación de la diferenciación condrogénica

Diferenciación	Cambios Histológicos	Matrix extracelular	Marcadores
Células mesenquimales condrogénicas		Col I	Sox9; Runx2
Precondrocitos		N-cam Col II	Sox9; Sox5; Sox6
Condrocitos germinativo		Col II	Sox9; Sox5; Sox6; FGF
Condrocitos columnares		Col II	Sox9; Sox5; Sox6; FGF
Condrocitos prehipertróficos		Col II	PTHr; Ihh; Runx2; Runx3
Condrocitos hipertróficos		Col X; Col VI	Runx2; Runx3; VEGF
Condrocitos terminales			Runx2

Ingeniería del tejido osteocondral.

Los procedimientos de ingeniería tisular se fundamentan en la posibilidad de movilización *in situ* de las células para restablecer la arquitectura y función de un tejido dañado. Este proceso requiere la interacción de las células responsables y de la matriz de soporte o de moléculas bioactivas con el fin de promover la diferenciación o la regeneración del tejido (Risbud et al 2002). El uso de biomateriales naturales o sintéticos como transportadores de MSC han mostrado una posibilidad de aplicación en el campo de la cirugía ortopédica, especialmente en cuanto a la formación de hueso. Los recientes avances en el campo de los biomateriales ha permitido la transición del uso de biomateriales biológicamente inertes, no porosos, a biomateriales osteoconductivos más porosos, y en particular, el uso de compuestos de una matriz para las células (Rose et al 2002), entre las que se encuentra la hidroxiapatita (Bruder et al 1998), o elementos biodegradables PLA y PGA (El-Amin et al 2002). Se describen distintos modos de aplicar las MSCs en los compuestos artificiales a aplicar (Caplan 2007). La reparación de defectos de cartílago usando MSCs se ha realizado inicialmente en modelos animales, usando como transportador de las células estructuras de

matrices. Estas matrices se formaban con PLA y PLGA. (Walkitani et al 1994, Caplan et al 1997, Quintavalla et al 2002, CATERON et al 2001, Li et al 2002). También se ha observado que el proceso de mineralización in vitro de las MSCs sobre una matriz es semejante al proceso que ocurre in vivo (Kihara et al 2004).

Aplicación de las MSCs en medicina regenerativa.

La aplicación clínica de las hMSCs en medicina regenerativa se realiza en la actualidad en numerosas aplicaciones, tanto en trasplantes locales de MSCs, trasplantes sistémicos de MSCs, terapia que combinan MSCs con terapia génica, e ingeniería tisular (Kasen et al 2008). La ingeniería genética con la aplicación del gen de la BMP-2 en las MSCs se ha usado para reparar defectos segmentarios de huesos en ratas (Tshuchida et al 2003). Los tejidos derivados de implantes de condrocitos presentan aún defectos de arquitectura y defectos de sustitución por hueso subcondral (Wakitani et al 2002)

1.2 Biología de la placa de crecimiento o Fisis

La placa de crecimiento es una estructura con forma de disco constituida por cartílago hialino que se halla intercalada entre la epífisis y la metáfisis de los huesos largos. (Fig 1.2.1 y 1.2.2).

La población celular del cartílago es de origen mesenquimático, las células se presentan en diferentes estados de su ontogenia, dependiendo de la edad, de la localización en el tejido y de la matriz que las rodea (Fig 1.2.3). Las células se encuentran incluidas en una laguna rodeada por una matriz que adquiere diferentes características moleculares y de tinción de acuerdo a la actividad de la célula que la secreta.

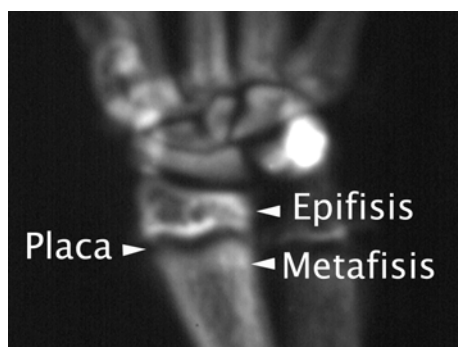


Imagen 1.2.1.: Radiografía de la extremidad superior de ratita



Imagen 1.2.2. Detalle de la fisis radial de ratita

El cartilago no esta vascularizado, esta compuesto en un 90 % de matriz homogénea, dúctil, elástica, que da la función al tejido y en un 10 % de células, muy pocas células en comparación con otros tejidos. Las células se comunican entre ellas a través de la matriz y mediante su propio sistema autocrino de producción de hormonas (Brighton 1987)

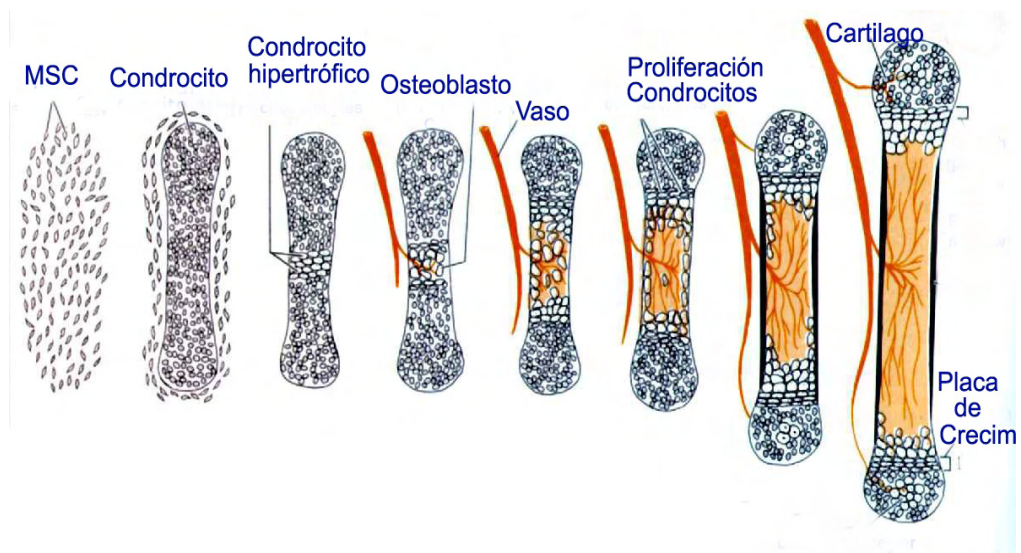


Imagen 1.2.3.Desarrollo óseo, formación de la placa de crecimiento

1.2.1 Histología de la placa de crecimiento

La placa de crecimiento esta rodeada de un componente fibroso, el anillo pericondral y desde la epífisis a la metáfisis, podemos distinguir tres zonas bien diferenciadas: zona germinativa, zona proliferativa y zona de cartilago hipertrófico (Brighton 1987) (Fig 1.2.4)

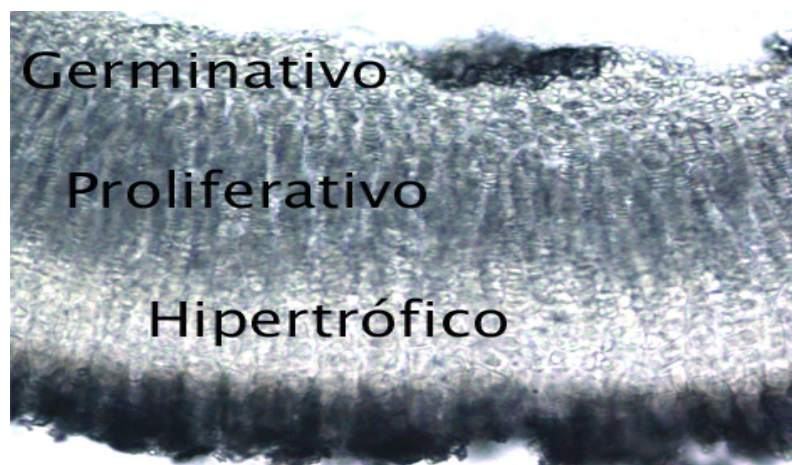


Imagen 1.2.4.Placa de crecimiento radial 4x Técnica de transiluminación

Zona germinativa “Resting zone”. Situada junto al centro de osificación epifisario. Constituida por células cartilaginosas aisladas de forma oval o redonda, con núcleo grande en relación al citoplasma y rodeadas de una matriz extracelular abundante. En esta capa se observan mitosis y existe una intensa síntesis de matriz extracelular. La ratio matriz/vol celular es alta, las células están en un estado quiescente. La matriz extracelular en esta zona presenta un menor número de vesículas y las fibras de colágeno se disponen sin una distribución homogénea, predominando el colágeno tipo II que inhibe la calcificación. (Iannotti et al 1990, Brighton 1987) (Fig 1.2.5 y 1.2.6)

Zona proliferativa. Constituida por células cartilaginosas en forma oval aplanada, cuyo eje mayor es perpendicular al del hueso. Estas células se disponen en columnas paralelas al eje longitudinal de la placa. En esta zona también se observan mitosis y existe una intensa síntesis de matriz extracelular. Las células de cada columna parecen dividirse al unísono pero de manera asincrónica con respecto a las de las columnas restantes. La matriz extracelular es rica en vesículas, siendo la zona proliferativa baja la de mayor contenido en vesículas. En la matriz extracelular encontramos tres zonas de ordenación del colágeno; zona pericelular rica en proteoglicanos y pobre en fibras de colágeno, zona territorial con abundantes fibras de colágeno dispuestas circularmente y zona interterritorial rica en fibras de colágeno dispuestas longitudinalmente. Se considera la célula más alta de cada columna como la célula progenitora. (Iannotti et al 1990) (Fig 1.2.5 y 1.2.6)

Zona hipertrófica. Los condrocitos de esta zona adquieren forma poligonal-redondeada y su tamaño aumenta a medida que se alejan de la epífisis. Se distingue una zona de maduración, una zona de degeneración y una zona de calcificación provisional. Las células tienen importante actividad metabólica. El glucógeno es importante en la parte alta de esta zona, disminuyendo hasta desaparecer completamente en la parte baja. Las últimas células no son viables y presentan fragmentación de la membrana celular y nuclear con pérdida de todos los componentes citoplasmáticos excepto unas pocas mitocondrias. El volumen citoplasmático del condrocito está aumentado, lo que implica acúmulo de agua y electrolitos. (Iannotti et al 1990, Brighton et al 1987) (Fig 1.2.5 y 1.2.6)

La matriz extracelular presenta abundantes vesículas donde se inicia la mineralización. Disminuye la expresión de colágeno II que es reemplazado por colágeno X. Se produce la mineralización de la matriz interterritorial limitada a los septos longitudinales situados entre las columnas de condrocitos. En la matriz también aparecen cadenas menos complejas de proteoglicanos (Hunziker et al 1987). Miralles y Delgado (1992) observaron diferencias histomorfométricas entre la región lateral y central de la fisis, apareciendo una mayor actividad proliferativa en la región lateral. Posteriores investigaciones han encontrado una mayor expresión de IGF-I en los condrocitos de la región lateral de la fisis, con respecto a la región central, lo que favorece la proliferación de estas células en la región lateral de la zona

proliferativa (Lazowski et al 1994)

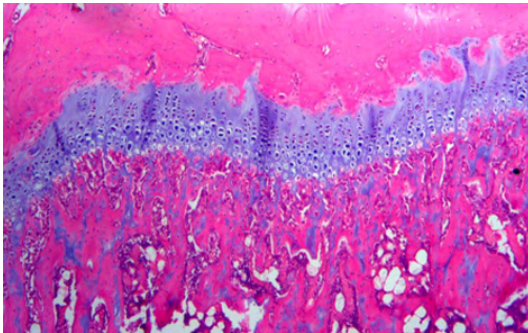


Imagen 1.2.5. Placa de crecimiento radial, tinción HE 4x

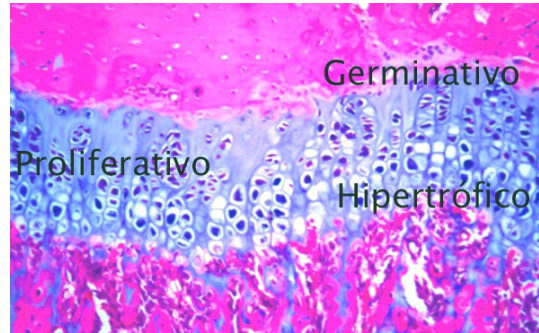


Imagen 1.2.6. Zonas de la placa de crecimiento, tinción HE 10x

Matriz. Consiste principalmente en colágeno, proteoglicanos y otras proteínas. El principal es colágeno tipo II, también se expresan colágeno tipo IX y X. El colágeno IX, rodea la superficie de las fibras de colágeno II. Se postula que el colágeno tipo IX media la interacción del II con otras moléculas de la matriz. El colágeno tipo X es de gran importancia en la calcificación.

La matriz del cartílago se caracteriza por presentar un aspecto homogéneo, en microscopía óptica, ya que el colágeno se ordena sólo en fibrillas. Es una estructura con un alto grado de basofilia y reacción PAS (+), dado la gran abundancia de glicosaminoglicanos, en estrecha relación con las fibrillas de colágeno tipo II. La matriz del cartílago articular es muy rica en **agrecan**, un proteoglicano de alto peso molecular que forma agregados moleculares con el ac. Hialuronico. **Agrecan** es el gran agregado de proteoglicanos del cartílago, es la principal molécula de proteoglicano en la matriz y proporciona las propiedades osmóticas necesarias al cartílago para resistir la presión de las cargas. **Decorina** y **Biglycano** son 2 pequeñas moléculas de proteoglicanos que tienen importantes funciones en la regulación de la fibrilogenesis del colágeno. (Olhsson et al 1993)

La diferenciación terminal del condrocito se asocia con un aumento del volumen celular, un aumento en la actividad fosfatasa alcalina y síntesis y secreción de colágeno tipo X, el único colágeno de cadena corta encontrado solo en la zona hipertrófica.

Pericóndrio. Es un anillo periférico de fibrocartilago que rodea la placa de crecimiento y le da estructura de soporte y crecimiento en anchura. El surco de Ranvier es una zona de células progenitoras como zona de reserva, que permite a la fisis crecer en anchura. El anillo de Lacroix, es una banda fibrosa que le da soporte mecánico a la placa.

1.2.2 Función y regulación de la placa

La función principal de la placa es el aumento en longitud de los huesos largos. Unos autores afirman que la célula troncal “*stem*” se encuentra en la zona germinativa de la placa de crecimiento (Brighton et al 1987), mientras que otros sugieren que se encuentra en la zona proliferativa (Siffert et al 1966). En la zona proliferativa, las células se dividen perpendicularmente al eje longitudinal de la placa. La división celular esta condicionada por factores genéticos, y pueden influir factores mecanicos, hormonales endocrinos y factores de crecimiento paracrinis y/o autocrinis. (Loveridge et al 1993). El aumento del numero de células de la zona proliferativa contribuye al incremento en altura de la placa de crecimiento. La orientación y el contorno alargado de los condrocitos de la zona proliferativa, apilados en columnas, facilita el crecimiento longitudinal de la placa de crecimiento, así como el incremento de volumen del citoplasma y del núcleo en los condrocitos de la zona hipertrófica. (Hunziker et al 1987). Los condrocitos sintetizan y secretan una matriz característica en el espacio extracelular. Los factores que regulan la síntesis de la matriz son algunos de los mismos factores responsables de la regulación del proceso de condrogénesis (conversión de stem cells en células que elaboran matriz cartilaginosa).

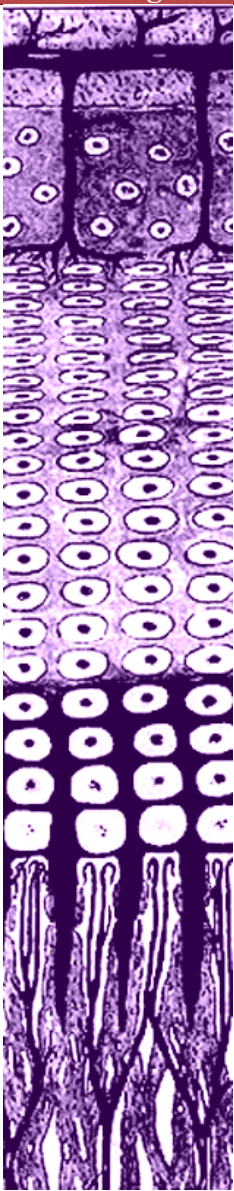
Mineralización.

La mineralización comienza en la matriz interterritorial de la zona hipertrófica. El aumento de la fosfatasa alcalina en las vesículas de la matriz extracelular, la presencia de proteoglicanos y de colágeno tipo X, son factores que se han propuesto como inductores de la mineralización (Hunziker et al 1987, Anderson 1995).

En la zona hipertrófica, zona de degeneración, la tensión de oxígeno es baja, por lo que se produce un metabolismo anaerobio, la acumulación de calcio en la mitocondria requiere energía y como en esta zona el glucógeno esta agotado, al no haber fuente de energía el calcio sale a la matriz extracelular, iniciando la calcificación de la matriz extracelular. (Brighton 1978)

Las vesículas intracelulares contienen calcio unido a fosfolípidos, anexinas, fosfatasa alcalina y proteasas y fosfolipasa de membrana, estas promueven la rotura de las vesículas. Las vesículas presentes en las zonas proliferativa baja e hipertrófica alta, zonas en las que se encuentra la mayor cantidad de calcio intracelular e intramitocondrial, se rompen. El fosfato cálcico se deposita en la matriz extracelular y se forman cristales de hidroxiapatita. (Anderson 1995). Las vesículas de la matriz se forman como brotes en la membrana plasmática del condrocito, son depositadas en la matriz que le rodea en la zona hipertrófica y sirven como nidos de mineralización. La mineralización ocurre de acuerdo a un patrón direccional, el mineral depositado son cristales de hidroxi-apatita. (Anderson 1995)

Tabla 1.2.1. Función y fisiología de la placa de crecimiento

Estructuras	Histología	Función	Respir./Vascul.	Fis. celular
Centro de osificación 2°			Arteria epifiseal	
Zona germinativa		Producción de matriz extracelular	Anaerobia Conc. O ₂ baja, los vasos atraviesan la zona	Células activas, con retic. endoplasmico vacuolas y mitocondrias
Zona proliferativa		Producción de matriz y crecimiento longitudinal	Aerobia Conc O ₂ muy alta aporte de sangre alto	Cel. retic. endoplas ribosomas, mitocondrias y membrana intacta
Zona hipertrófica alta: maduración del condrocito		Preparación de la matriz para la calcificación	Aerobia.->anaerob Conc O ₂ pobre	Células aun en buen estado
Zona hipertrófica media: degenerativa		Preparación de la matriz para la calcificación	Anaerobia Conc O ₂ pobre	Deterioro celular
Zona hipertrófica terminal		Calcificación de la matriz	Anaerobia Conc O ₂ muy pobre Aporte de sangre nulo	Muerte celular
Zona esponjosa primaria		Invasión vascular y formación de trabeculas primarias	Anaerob.->aerobia O ₂ : pobre-> bueno Aporte de sangre bueno	
Zona esponjosa secundaria		Remodelación y reemplazamiento de trabeculas 1ª por trabeculas óseas	Aerobia Conc O ₂ Aporte de sangre excelente	

El colágeno tipo X se localiza en la superficie de las vesículas de la matriz y participa en la mineralización de esta. La presencia de proteoglicanos agregados en las zonas germinativa y proliferativa alta inhiben la calcificación, mientras que la presencia en las zonas proliferativa baja e hipertrófica de proteoglicanos no agregados la favorecen. La degradación de los proteoglicanos es requerida para la mineralización de la matriz. (Dean et al 1992).

En la zona de invasión vascular, los capilares de la metáfisis, atraviesan el ultimo septo

Introducción

transversal de mineralización del cartílago y entran en la laguna del condrocito hipertrófico. Aprox 2/3 del septo longitudinal son reabsorbidos activamente por los **condroclastos**, mientras que 1/3 sirve como plantilla para la deposición de matriz ósea por los **osteoblastos**. Las espículas mixtas que contienen ambos, cartílago mineralizado y matriz ósea, son las trabéculas primarias, que se remodelan en la metáfisis a trabéculas de lamina ósea o trabéculas secundarias.

Regulación celular.

Como en el caso de miogénesis, adipogénesis y osteogénesis, la diferenciación de células mesenquimales en condrocitos esta regulada por la actividad de factores de transcripción del DNA que controlan la expresión de los principales genes que codifican las proteínas de la matriz extracelular del cartílago. En el caso del cartílago este factor de transcripción es **Sox 9**, el cual se requiere para la expresión de varias proteínas específicas de la matriz, colágeno tipo II, tipo IX, tipo XI y agregan. Sox 9 se une a regiones específicas aumentadas en los genes diana, y en conjunción con otras proteínas, L-Sox 5 y Sox 6, activan la transcripción genética. Sox 9 también controla la expresión de proteínas de la superficie celular involucradas en procesos de condensación. (Ballock et al 2003)

La proliferación ocurre en una estrecha banda de células en la región proliferativa de la placa. La proliferación puede producir 8 nuevas células en cada columna por día. Estudios histomorfométricos en ratas muestran que una capa de células hipertróficas se elimina de la placa cada 3 horas.

Recientemente se sugiere que la proliferación de los condrocitos en la placa esta bajo el control de un bucle local retro-alimentado que envuelve 3 señales moleculares sintetizadas por los condrocitos de la placa:

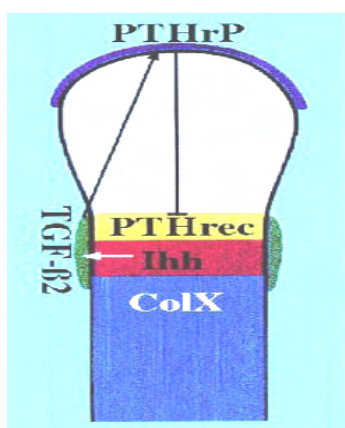


Imagen 1.2.7. bucle de retro-alimentación. Ballock 2003

- Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)
- Indian hedgehog (Ihh)
- Transforming growth factor- β (TGF- β)

Este bucle retro-alimentado actúa regulando la velocidad a la cual las células de la placa dejan la zona proliferativa y caminan irreversiblemente a células hipertróficas.

Las células en la región periarticular de los huesos largos producen PTHrP, los receptores de PTHrP se encuentran primariamente en células pre-hipertróficas

del proliferativo bajo. PTHrP retrasa la diferenciación hipertrófica en la zona baja del

proliferativo, manteniendo las células en un fenotipo pre-hipertrófico.

Las células de la placa que han empezado a sufrir diferenciación hipertrófica secretan Ihh este transmite de vuelta una señal a través del pericondrio a las células peri-articulares para que incrementen la producción de PTHrP. Esta pericondrial transmisión envuelve los receptores de Ihh, patched y gli, los cuales son localizados primero en las células del pericondrio, así como la producción de TGF- β por células del pericondrio en respuesta a Ihh.

TGF- β entonces actúa en la en las células pericondrales y periarticulares incrementando la síntesis de PTHrP y también puede actuar directamente en los condrocitos para inhibir la hipertrofia. Este incremento en la síntesis de PTHrP en las células periarticulares es transmitido a las ultimas células proliferativas que están expresando el PTHrP receptor, el cual ralentiza la producción de células que producen Ihh, de ese modo controla el ritmo de diferenciación hipertrófica. Experimentos en ratones han confirmado este papel de PTHrP en el control de la transición entre proliferación y diferenciación del condrocito. (Ballock et al 2003)

Martos y cols estudian dos posibles moduladores de la diferenciación de los condrocitos en la placa de crecimiento, son los factores de transcripción C/EBP β (CCAAT/*enhancer-binding protein beta*, relacionado con la diferenciación y actividad celular y CHOP (C/EBP-*homologous protein*, relacionado con la muerte celular). (Martos et al 2003). Estos factores se encuentran en las zonas germinativa alta y baja de la fisis. En el estudio observaron diferencias significativas en la presencia de ambos factores en la zona proliferativa alta y baja: CHOP tiene una menor expresión que C/EBP β en la zona proliferativa y una mayor expresión en la zona proliferativa baja.

Expresión molecular en los condrocitos

En el condrocito se expresan en mayor o menor grado: **Insulin growth factor** (IGF-I & IGF-II). Uno de los factores de crecimiento más potentes que afectan al desarrollo del esqueleto, anteriormente llamado somatomedins. IGF son sintetizados en el hígado y circulan unidos a una proteína *carrier*. La IGF-I se produce localmente por el condrocito (Reinecke et al 2000). Los osteoblastos sintetizan IGF, las células humanas sintetizan mucha más IGF-II que IGF-I, la IGF-II esta presente en la matriz del hueso humano unas 10-15 veces más concentrada que la IGF-I, sin embargo en la rata la IGF-I es más importante en la estimulación, diferenciación, proliferación y mantenimiento del fenotipo del condrocito. Factores de crecimiento epidérmico (**Epidermal growth factor**, EGF); factor de crecimiento fibroblástico (**Fibroblast growth factor**, FGF); factor de crecimiento transformante (**Transforming growth factor**, TGF); (Grimsrud et al 2002); factor de crecimiento derivado del hueso (**Bone derived growth factor**, BDGF, o B2-macroglobulin); proteína morfogenética del hueso (**Bone morphogenetic proteins** (BMP) **Citoquinas**. Una citoquina puede ser definida como un producto celular soluble, de bajo peso molecular que afecta a la actividad de otras células de manera paracrina o endocrina. Uno de los mecanismos por los

cuales las citokinas provocan sus efectos en el cartílago es por la estimulación del óxido nítrico (NO), lo producen vía estimulación de NO-sintasa. El NO causa diferenciación y apoptosis. **Tiroxina**. Esta hormona es esencial para el crecimiento del cartílago. Incrementa la síntesis de DNA en las células de la zona proliferativa y secundariamente incrementa la síntesis de glicosaminoglicanos, colágeno y la actividad de la fosfatasa alcalina. El efecto está mediado por una sinergia entre tiroxina e insulin-like growth factor somatomedin-C (IGF-I / SM-C); **Hormona del crecimiento** (GH) GH y sus mediadores las somatomedinas actúan principalmente en la proliferación celular. **Hormona paratiroides**, PTH. el receptor de la PTH, PTHrP receptor se expresa en los condrocitos prehipertróficos **Indian hedgehog** (Ihh) se expresa en los condrocitos prehipertróficos y hipertróficos tempranos; **Glucocorticoides**; **Andrógenos**; **Estrógenos**.

1.3 Clínica del trasplante de placa

Históricamente la placa de crecimiento se ha transplantado desde finales de siglo XIX, tanto clínica como experimentalmente. Los resultados de estos trasplantes son muy variados según los autores, conduciendo normalmente al fracaso (Goldberg et al 1987, Harris et al 1965, Hass 1950).

Se han realizado muchos estudios para determinar el tiempo de isquemia y el daño producido durante el procedimiento quirúrgico (Shimizu et al 1995). Se han realizado trasplantes no vascularizados, trasplantes vascularizados en la zona metafisaria, en la zona epifisaria y en ambas y parece haber quedado demostrado que es necesario la vascularización de ambos lados para el éxito del trasplante (Peterson et al 1993, Bowen et al 1988)

Desde el punto de vista de la vascularización existen dos hipótesis de trabajo

- Unos defienden la necesidad de la revascularización del disco fisario como indispensable para que la placa una vez transplantada continúe su crecimiento (Bowen et al 1988, Drzewiecki et al 1992, Peterson et al 1993, Shea et al 1997, Yaremchuk et al 1985)
- Otros se inclinan por una auto-revascularización de la placa como método alternativo (Takato et al 1993)

Se desconoce hasta el momento de qué manera los injertos avasculares de placa de crecimiento tienen su propio potencial de crecimiento. La respuesta inmune es de suma importancia ya que de ella va a depender en gran medida la incorporación del injerto y su posterior supervivencia.

Hoy sabemos, contrariamente a lo que se creía antes, que el hueso tiene una capacidad inmunógena propia debida a su capacidad para expresar antígenos de histocompatibilidad, Ag-HLA (Human Leucocyte Antigens) (Goldberget al 1987). La capacidad de expresión antigénica varia en función de los distintos componentes del hueso. Las porciones osteogénica, hematopoyética, neuronal, mineral y grasa son muy poco antigénicas, el colágeno es débilmente antigénico, mientras que la matriz posee gran componente inmunógeno. (Horowitz et al 1991), por tanto hasta que los mecanismos inmunógenos del hueso sean bien conocidos, el tejido óseo del donante debe ser comparado con el del receptor mediante la determinación de HLA.

La respuesta inmunológica una vez que se ha realizado el injerto es muy compleja. En el momento del trasplante se produce una gran respuesta inflamatoria local. Esta respuesta inflamatoria provoca la proliferación de macrófagos que secretan citoquinas (IL-1, FNT- α , FNT- β). Se desarrolla una respuesta celular específica, mediada por linfocitos T segregados por el timo, así como una hipertrofia de los nódulos linfoides regionales. Se produce un desarrollo de linfocitos T- antígeno-específicos frente a los antígenos HLA clase I de la superficie de las células del injerto. Esta respuesta se ve mantenida gracias a la reacción inflamatoria local antes indicada. (Horowitz et al 1991). Los linfocitos T son los primeros que reaccionan contra el injerto, y actúan tanto sobre los antígenos HLA clase I como sobre los de clase II.

El injerto desarrolla una respuesta defensiva frente al huésped mediante un aumento de la expresión de HLA tipo I. Esto se comienza a observar a las 2 semanas del trasplante y continua elevada hasta la semana 14. El numero de osteocitos del trasplante disminuye con el paso del tiempo, pero los que sobreviven, tienen mayor expresión de HLA tipo I en su superficie. Las reacciones inmunológicas van remitiendo con el paso del tiempo. La médula ósea que es la parte más inmunógena, es reabsorbida lentamente por el huésped. Esto permite un cierto equilibrio entre la formación de antígenos y anticuerpos (Hiestand et al 1989)

El desarrollo de técnicas microquirúrgicas ha hecho factible el trasplante libre de tejido. y el trasplante de fisis vascularizada se ha convertido en una solución biológicamente atractiva para la corrección de defectos esqueléticos en niños. Estudios experimentales realizando trasplantes tanto ortotópicos como heterotópicos y autólogos como heterólogos se han descrito desde 1979, aunque no son muy comunes dada la dificultad en la obtención de un tejido donante adecuado. (Bowen et al 1988, Goldberg et al 1987, Muramatsu et al 1997, Shigetomi et al 1993, Stevens et al 1995). En los trasplantes alogénicos se puede usar un donante cadáver. los trasplantes alogénicos vascularizados no se han realizado en humanos ya que se necesita una inmunosupresión correcta para evitar el rechazo en el receptor. El fallo en el trasplante comienza con un engrosamiento de la fisis a expensas de la zona hipertrófica que en ausencia de nutrición vascular epifisaria, se convierte en hipercelular y desorganizada. (Boyer et al 1995)

Se han realizado estudios para demostrar la influencia hormonal en el crecimiento de la placa, Stevens demostró que el potencial de crecimiento es el que se corresponde con la

edad del donante (Stevens et al 1999)

El trasplante de placa de crecimiento en nuestros días continua planteando muchas incógnitas. El problema fundamental radica en que, a pesar de los numerosos estudios, todavía no se ha encontrado el mecanismo exacto de nutrición de la fisis, es necesario aún el desarrollo de líneas de investigación alternativas que permitan aclarar las dudas fisiológicas que todavía plantea la placa de crecimiento.

1.4 Justificación del proyecto de estudio

Desconocemos en la actualidad de forma completa las moléculas de señalización celular que participan en la citocinesis y en la ortogénesis de la placa de crecimiento, sabemos que la expresión de ciclinas es mayor en la zona proliferativa, que la expresión de BrdU, aunque en menor cantidad también predomina en el proliferativo alto, que la señal de TUNEL se expresa en las 3 zonas. (Martos et al 2003). Los genes *indian*, *PTHrp*, *MBP2* e *insulin* (*ITNF α*) se expresan durante los mecanismos de citocinesis.

Sabemos que la placa esta regulada por factores endocrinos como GH, TH, Prolactina, hormonas esteroideas, Vit D3, por factores paracrinicos como IGF, *indian*, *PTHrp*. Sabemos que la placa esta regulada por factores de transcripción como *CBP α* (germinativo) que tiene cierta relación con factores de GH y por factores de transcripción *CBP β* y *CHOP* que se manifiestan en proliferativo alto y bajo. Y sabemos que entre los factores génicos precoces que actúan en condrogénesis están *Sox9* y *FGF2*. Parece que *Sox9* es la llave que inicia la cadena de expresión génica para la diferenciación condrocítica. *Sox9* interviene en la diferenciación 'in vitro' e 'in vivo' de las potentes células madres mesenquimales (MSC) en MSC-condrocíticas. (Richardson et al 2006)

A partir de los proyectos (European Commision Research) para el desarrollo de nuevas terapias de ingeniería genética con MSC, estas células se están utilizando ya en estudios clínicos como reparadoras de cartílago y en procesos inflamatorios como hemos indicado en el punto previo.

No cabe duda que la placa trasplantada sufre un daño celular y en el momento del trasplante se produce una gran respuesta inflamatoria local. (Horowitz et al 1991).

Sabemos los problemas clínicos que plantea la alteración de la placa. Estas lesiones pueden llevar a alteraciones del crecimiento en los niños, produciendo una asimetría en los miembros. El desarrollo de la microcirugía hace posible el trasplante libre de tejido. Tras la revisión bibliográfica efectuada quedan planteadas numerosas preguntas tanto sobre las

células MSC como sobre la placa de crecimiento.

- **Problema de las células pluripotenciales como nueva terapia biológica, MSC.** Sigue estando en curso de estudio, por lo que por el momento no se puede llegar a conclusiones puntuales. Muchos de sus aspectos quedan fuera del alcance del presente trabajo. Sabemos en la actualidad que la células MSC producen numerosos biofactores de crecimiento. Esto nos hizo plantear la pregunta ¿La administración de células pluripotenciales, rMSC, podrían actuar, bien de forma directa o bien de forma indirecta por sus biofactores en la placa de crecimiento? En el presente trabajo se han seleccionado las siguientes preguntas: ¿Actúan las MSC a nivel de la placa de crecimiento normal? ¿Actúan las MSC en la reparación de una placa trasplantada? ¿Que densidad de MSC son necesarias para inducir activación, si la hubiera?
- **Problema de la placa de crecimiento.** La placa de crecimiento, a pesar de ser objeto de numerosos estudios, presenta numerosos problemas no resueltos. Así encontramos que el grupo dirigido por Brighton, en el campo de la ortopedia (USA) , asume que las células responsables de la condrogénesis en el crecimiento de la placa son las primeras células del proliferativo. Mientras que el grupo dirigido por Nilsson , en el campo de la endocrinología (Europa), considera a las células del germinativo como verdaderas células troncales de la placa, asumiendo de esta forma que estas células germinativas serian las células progenitoras de las células proliferativas. Hasta este momento no existen evidencias experimentales que confirmen ambas teorías. En la actualidad no se conoce la función de la zona germinativa. Esta cuestión de la inter-relación entre la zona del germinativo y la zona del proliferativo, así como otras numerosas cuestiones referentes al crecimiento lateral de la placa etc., nos ha llevado a plantearnos cuestiones como ¿Qué capacidad de condrogénesis tienen el germinativo y proliferativo en la placa de crecimiento? ¿Cuales son los cambios fenotípicos propios de este proceso de condrogénesis?
- **Problema de la administración células troncales, tipo MSC, durante el proceso de condrogénesis de la placa de crecimiento.** La conjunción de los dos problemas anteriores nos ha llevado a plantear la siguientes preguntas : ¿Qué tipo de estímulo puede producir la administración de células MSC sobre una placa de crecimiento normal? ¿Qué cambios se producen en las zonas del germinativo y/o proliferativo? ¿Cuales son los cambios fenotípicos propios de esta activación, si la hubiera? ¿Es necesario el contacto célula- célula para la respuesta? Como modelo de estudio se ha escogido el trasplante de placa de crecimiento, que puede orientar sobre el tipo de respuesta y por las importantes implicaciones que tiene en clínica humana. Dado que el comportamiento funcional de la placa de crecimiento depende de su patrón vascular

Introducción

y este se daña en el trasplante, nos hemos preguntado en qué medida si se respeta un sector de la metáfisis, lo que acelera el callo óseo, sería beneficioso en el curso del trasplante de placa.

2 Hipótesis

Tras el análisis bibliográfico y estudios previos realizados en nuestro laboratorio se han planteado las siguiente preguntas:

- ¿Qué participación tienen, desde el punto de vista del fenotipo celular, la zona germinativa y la zona proliferativa en el desarrollo de la placa de crecimiento?
- ¿La administración de células troncales, tipo rMSC, puede repercutir en la función de la placa de crecimiento trasplantada; y si actúan, cuales son los cambios fenotípicos que se producen en la placa de crecimiento?
- ¿Qué aporta la conservación de la metáfisis ósea en el trasplante de placa de crecimiento?

Objetivos:

1. Estudiar en que medida las células de la zona del germinativo y del proliferativo participan en producir células de su propia zona y/o de la vecina.
2. Estudiar el comportamiento tisular de la placa de crecimiento trasplantada y la normal tras la administración de células troncales, rMSC en distintos tiempos de administración y de evolución del ensayo.
3. Estudiar el comportamiento de la arquitectura tisular de la placa de crecimiento trasplantada con y sin metáfisis ósea, en distintos tiempos de evolución

Hipótesis

3 Planteamiento

Para estudiar los objetivos señalados proponemos:

1. Estudio de técnicas generales:
 - a) Preparar técnicas de anestesia, cirugía, eutanasia, autopsia
 - b) Preparar las técnicas de histología y tinciones básicas; de inmunohistoquímica, anti BrdU, hibridación *in situ* del cromosoma Y.
 - c) Preparar técnicas de radiología e histometría
 - d) Preparar las técnicas generales de extracción de células troncales, rMSCs, para su administración en ratas. Preparar técnica de cultivo de condrocitos, para extraer sobrenadante para estimulación.
2. La primera pregunta que se nos plantea al realizar un trasplante de placa de crecimiento es qué porcentaje de mortalidad de células hay en la placa una vez extraída, mantenida en cultivo, o colocada en su lecho.
 - a) Para responder a esta pregunta en tiempo real en la actualidad se carece de técnicas idóneas. Por ello se ha implantado una técnica nueva, y simple, de estudiar la placa por transiluminación.
3. Estudiar la influencia, durante el crecimiento de la placa, de la zona germinativa en la zona del proliferativo y viceversa. Conocer que posibles cambios específicos se producen en estas zonas, nos ayudará a entender mejor las respuesta tisular del trasplante de placa de crecimiento.
 - a) Primero se han realizado estudios *in vitro*. Para ello se ha cultivado la placa de crecimiento de rata. La placa entera y dividida en 2 fragmentos distinguiendo:
 - un fragmento proximal correspondiente a la zona germinativa
 - un fragmento distal que incluye proliferativo e hipertrófico
 - una sección de placa entera incluyendo germinativo, proliferativo e hipertrófico.

Planteamiento

- Esto lo haremos sobre una serie de grupos
 - Control sin estimulación
 - Estimulación con Insulina
 - Estimulación con TGF, insulina y glucocorticoides
- b) En segundo lugar se han realizado estudios *in vivo* divididos en dos grupos
 - En un grupo se ha realizado ensayo de estimulación de la zona del germinativo y ensayo de resección
 - En un segundo grupo se han realizado ensayos de interposición de membrana, de 0,22 μ entre las zonas del germinativo y proliferativo.
- 4. Previo al trasplante de placa de crecimiento surge una pregunta no resuelta, ¿trasplantar con anillo pericondral o si el anillo?
 - a) Para intentar responder se han realizado una serie de ensayos de cultivo de placa de crecimiento en cápsula renal
- 5. Realización de trasplante de placa de crecimiento en rata
 - a) Tipo de trasplante: trasplante alogénico, avascular, ortotópico, de placa de crecimiento de rata macho (donante) a hembra (receptor)
 - b) Trasplante de placa de crecimiento distal del radio, rata de 15 días, con anillo pericondral. Se han establecido dos grupos: 1º Trasplante simple de placa; 2º Trasplante con metáfisis ósea
 - c) Estimulación con células MSC
 - Esto se realizara sobre una serie de grupos
 - Control sin estimulación
 - Estimulación con MSC en el momento del trasplante
 - Estimulación con MSC a los 15 días del trasplante
 - Valoración de la evolución del trasplante en cada grupo a las 6, 12 y 24 semanas.
 - Realizando las siguientes técnicas de estudio
 - Estudio radiológico

- Estudio histológico con tinciones de HE, Alcian-blue-PAS.
 - Técnicas de histometría de placa.
 - Estudio estadístico
6. Análisis de los resultados, descriptivo y estadístico y discusión de los mismos.
 7. Establecer las conclusiones que correspondan a las hipótesis planteadas.
 8. El trabajo se acompañara de iconografía, tablas y bibliografía.

4 Material y Métodos

4.1 Materiales y reactivos

4.1.1 Animales

Se han utilizado ratas albinas de la cepa Sprague Dawley, machos y hembras criados en las instalaciones del Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

El animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, cumple el RD 223/1988, BOE 19 de marzo de 1988 relativo a centros de experimentación animal y protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y esta autorizado y registrado en la Comunidad de Madrid.

4.1.1.1 Condiciones de estabulación

Los animales han sido mantenidos durante todo el tiempo de duración del estudio en las condiciones siguientes:

- **Jaulas:** de policarbonato transparente autoclavables a 121°C en 2 dimensiones Tipo I 237 x 147 x 133 Superficie del suelo 200 cm² Capacidad 2 a 5 animales. Tipo II 266 x 214 x 143 Superficie del suelo 360 cm² Capacidad 3 a 9 ratones. Con cubierta individual en ambas de acero inoxidable con compartimento para comida y porta biberón.
- **Biberones:** de polietileno de 500 ml de capacidad, autoclavables a 121°C durante 20 min. y tetinas de biberón en embudo de acero inoxidable.
- **Condiciones ambientales:**
 - Humedad relativa: 55 % ± 10 %.
 - Temperatura : 20-24 °C.
 - Renovaciones de aire: 16 renovaciones/hora
 - Ciclo lumínico: 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

- **Agua de bebida:** con canalización específica en tubo de PVC de 1/2". Con depósito de seguridad de 100 l. provisto a su salida de un filtro de Millipore con carcasa CINTROPUR NW32 con camisa filtrante de 10 μ . La entrada de agua al depósito es de la red general.
- **Comida:** mantenidos con pienso completo de mantenimiento para rata-ratón (RMM de Harlan Iberica), certificado.

Los animales de ensayo están ubicados en Racks, en salas de estabulación separadas destinadas a observación. Se identifica la jaula con una etiqueta conteniendo todos los datos y disponen de agua y comida *ad libitum*.

4.1.1.2 Distribución y número de animales usados

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos y hembras en un total de 315 animales distribuidos en los siguientes grupos:

- Extracción de células MSCs pluripotenciales: 10 machos de 15 días
- Extracción de condrocitos: 5 hembras de 8 días.
- Estudios de transiluminación:
 - Estudios en placa normal: 12 hembras de 11-15 días
 - Estudios de mortalidad celular: 9 hembras de 15-18 días
- Cultivo de placa de crecimiento *in vitro*
 - Técnica de cultivo simple de placa: 4 ratas hembras
 - Técnica de co-cultivo de secciones: 4 ratas hembras.
- Cultivo de placa de crecimiento en cápsula renal:
 - Donantes de placa: 6 machos de 15 días
 - Receptores del injerto: 18 hembras de 15 días
- Estudios sobre la zona de germinativo y proliferativo
 - Estudio de resección de la zona germinativa: 18 hembras de 12-15 días
 - Estudio de interposición de membrana: 9 hembras de 12-15 días
- Aloinjerto ortotópico avascular de placa de crecimiento

- Método quirúrgico E, trasplante de placa distal del radio simple: 60 ratas macho donantes y 100 ratas hembra receptoras
- Método quirúrgico J, trasplante de placa distal del radio con metáfisis: 20 ratas macho donantes y 40 ratas hembra receptores.

4.1.2 Aparatos

- Baño termostático Selecta Mod Precisdig
- Cabina de flujo laminar Clase II de Telstar Mod. Bio-II-A/P
- Cabina de Rayos X, Hewlett-Packard, modelo Cabinet X-Ray system n° 43855N, Faxitron Series (Animalario Fac. Med. UAM)
- Cámara digital acoplada a microscopio modelo DC 200
- Centrifuga Beckman Coulter Mod Allega X12R
- Dispensador de parafina, Selecta
- Estufa de cultivo, marca Selecta Mod Incudigit 52L
- Incubador de CO₂ Nuaire Mod NU-4850
- Lupa estereoscópica con transiluminación marca Leitz Mod. HM-LUX3
- Microscopio estereoscópico Cambridge Instrument Mod Z30E
- Microscopio invertido, Lan Optics Mod XDS 1B
- Microscopio marca Leica, modelo DM LB
- Microscopio óptico, Oxford Trade.
- Microtomo mecánico, Leica, modelo Jung RM 2025 (Animalario Fac. Med. UAM)
- Ordenador personal MacBook Pro 2.4 Ghz Intel Core 2 Duo, 1680 x 1050 pixels, 4GB memory, 160 GB hard drive, 8x double-layer SuperDrive, NVIDIA GeForce 8600M GT graphics with 256MB SDRAM
- Ordenador personal microprocesador AMD-K7 1,1 Ghz, 128 MB RAM y disco duro 20 GB
- Reveladora automática convencional, AGFA, modelo CURIX 60, (Centro de Investigaciones Biomédicas del C.S.I.C.)

4.1.3 Materiales

- Agujas insulina 0,33 x 8 mm Becton Dickinson
- Cuchillas desechables de microtomo marca Feather, modelo R 35
- Esponja de colágeno, Espongostan
- Frascos de cultivo Roux de 25 y 75 cm² de poliestireno Cultex
- Hemocitómetro de Neubauer
- Instrumental quirúrgico convencional e instrumental quirúrgico específico de microcirugía.
- Membranas estériles de 0.22 µ de nitrato de celulosa de Millipore.
- Placas de cultivo celular de 6 y 24 pocillos BD Falcon Multiwell Plate polystyrene Becton Dickinson.
- Placas radiográficas, marca Kodak X.OMAT MA film (18 x 22 cm)
- Programa de medición de imágenes, ImageJ 1.37v National Institutes of health, USA
- Programa de tratamiento de textos y hoja de calculo para tratamiento estadístico, NeoOffice 2.1 Patch 7, OpenOffice org. para Mac OS X
- Programa montaje de imágenes Quark X Press 4.2
- Programa para captura de imágenes DC Viewer.
- Programa tratamiento de imágenes Adobe Photoshop CS 8.0

4.1.4 Medios de cultivo

- **DMEM básico:** Dulbecco's Modified Eagle Media, bajo en glucosa (1000 mg/l) (Invitrogen Ref 21885-108), sin suero, suplementado con Glutamina 4 mM, Hepes 15 mM, Acido ascórbico 15µg/ml, solución de penicilina 100 UI+estreptomicina 100 µg. Este medio se ha utilizado para el cultivo “in vitro” de la placa de crecimiento
- **Medio de cultivo de MSC:** medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO BRL, Gaithersburg, E.E.U.U.),

2mM de glutamina, 400 μ M de aminoácidos no esenciales, 0,01% de estreptomicina, 0,06% de penicilina G y 50 μ g/ml de gentamicina. 10 g/l de glucosa, más suero seleccionado para estas células.

- **Medio de cultivo de condrocitos:** medio DMEN al cual se le añaden por cada 100 ml :2ml de glutamina 50X, 2ml de Hepes 0.75 M, 0.2ml de kanamicina, 0.5ml de nistatina, 1ml de penicilina/estreptomicina, 10 ml de suero fetal bovino, 1500 mg de ácido ascórbico.
- **DMEM-Ins:** DMEM básico enriquecido con insulina: Se ha utilizado medio DMEM básico suplementado con: Glutamina 4 mM, Ácido ascórbico 15 μ g/ml, solución de penicilina 100 UI+estreptomicina 100 μ g. piruvato, 400 μ M de aminoácidos no esenciales, y 1% de ITS (mezcla de insulina+transferrina+selenio)
- **DMEM-Ins-TGF** Tiene la misma composición del medio anterior al que se le ha añadido como suplemento 10 ng/mL de TGF- β 1 y 200 μ g/ml dexametasona

4.1.5 Soluciones y reactivos

- **Ácido ascórbico:** Sigma preparado a una concentración 15 mg /ml de agua destilada.
- **Ácido periódico al 0,5 %:** Ácido periódico 1 g. Agua 200 ml. solución extemporánea.
- **anti-BrdU/nucleasa** mezcla: bromodeoxyuridine antibody 130 μ l (Amersham biosciences UK Ltd, Ref RPN202) Anti-5-2'-deoxyuridine de origen murino, concentrado en Tris-Buffer- salino conteniendo 0,8 % de Seroalbumina bovina. Nucleas en Tris-Buffer- salino conteniendo 1 % de Seroalbumina bovina.
- **anti-digoxigenin** anticuerpo, conjugado a fosfatasa alcalina, (1:500)
- **Azul Alcian:** Azul alcian 2,5 g. Acido acético al 3 % 250 ml. pH: 2,5
- **Biotina-streptavidina** : Biotin-streptavidin detection reagents. (Amersham Biosciences)
- **Bisulfito sódico al 2 %:** Bisulfito sódico 5 g. Agua destilada 250 ml
- **Bromo-deoxiuririna (BrdU):** 5-bromo-2deoxyuridine, Sigma.
- **Buffer formalina al 7%:** Fosfato sódico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 4,55g; Fosfato disódico (PO_4HNa_2) 6,5 g; Formol comercial (40%) 70 ml; agua destilada 930 ml
- **Colagenasa:** colagenasa al 0.2% en GBSS. Colagenasa tipo V, 100 mg, Sigma.

Material y Métodos

- **Dexametasona:** Sigma. (Peso molecular:392.5). Añadir 5 ml de agua bidestilada obteniendo una concentración de DEX de $5 \cdot 10^{-2}$ M.
- **Diaminobencidina:** 3,3'-Diaminobenzidine (3,3', 4,4'-tetraaminobiphenil) (DAB), 100 mg, SIGMA.
- **DNA de espermatozoides de salmón sonicado:** Salmon Sperm DNA Sonicated (Abnova Ref R0014), disuelto en agua desionizada, con unos fragmentos de 300-700 pares de bases. Conc. 10 mg/ml. Conservar a -20°C , hervir 3 min y enfriar en baño de hielo antes de usar.
- **Eosina alcohólica:** Eosina 1 g; Etanol de 96° 100 ml; una gota de ácido acético glacial por cada 100 ml de disolución.
- **GBSS. Gey's Balanced Salt Solution:** Usado en cultivos de condrocitos. NaCl 7,0 g/l; KCl 0,37 g/l; CaCl_2 0,17 g/l; $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,21 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,07 g/l; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0,30 g/l; KH_2PO_4 0,03 g/l; NaHCO_3 2,27 g/l; Glucosa 1,0 g/l
- **Gentamicina:** solución de Sigma (Ref. G-1397) diluida en agua calidad inyectable hasta una concentración de 50 mg/ml. se añade extemporáneamente al medio de cultivo en la proporción de 0,1 ml /100 ml de medio.
- **Glutamina:** Sigma preparado a una concentración 200 mM (12,92 g de Glutamina en 100 ml de agua destilada), se añade al medio en la proporción de 1 ml/100 ml de medio, concentración final de glutamina en el medio de 2 mM
- **Hematoxilina de Carazzi:** Yodato potásico 0.1 g; Hematoxilina 0,5 g; Sulfato de aluminio y potasio (alumbre potásico) 20 g; Glicerina 100 ml; Agua destilada 400 ml. Se deja madurar mínimo un mes en frasco destapado Filtrar antes de su utilización.
- **Hepes:** Sigma (Ref. H-9136) a una concentración 0,75M (17,87 g /100 ml de agua), se añade al medio en la proporción de 2 ml /100 ml de medio, concentración final de Hepes en el medio de 15 mM
- **Inmunoglobulina biotinilada** anti-conejo como segundo anticuerpo (ZYMED),
- **Insulina-transferrina-selenio** (ITS), GIBCO™ Insulin-Transferrin-Selenium-G Supplement (100X) from Invitrogen 1.0 mg/ml insuline pancreatica bovina, 0.55 mg/ml de transferrina humana, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ selenito sodico, 50 mg/ml seroalbumina bovina y 470 $\mu\text{g/ml}$ de acido linoleico.
- **Kanamicina:** Kanamycin sulfate (Fluka 60615)
- **Nistatina:** suspensión de Sigma (Ref. N-1638) con una concentración de 10.000 UI/ml, diluida en PBS hasta una concentración final de 50 UI/ml. se añade extemporáneamente al medio de cultivo en la proporción de 0,5 ml / 100 ml de medio.
- **Penicilina-estreptomicina:** concentrado de penicilina-estreptomicina de Sigma (Ref.

P-0781) concentración de 100.000 UI de penicilina + 10 mg de estreptomicina. se diluye en agua hasta una concentración final de 100 UI de penicilina +100 µg de estreptomicina / ml. se añade extemporáneamente al medio de cultivo en la proporción de 1 ml / 100 ml de medio.

- **SCC Buffer solution 20x pH 7,0:** Citrato sódico dihidratado 100,0 g/l; ClNa 175,2 g/l
- **Solución anestésica:** Ketolar (Ketamina) 50 mg / ml, de Parke Davis Cod 776211; Rompun (xilacina) sol inyectable al 2 % 10 ml de Bayer cod. 596790; Atropina de Braum 1 mg (10x1) Cod. 896829. La mezcla anestésica contiene: Ketamina 3,2 ml; Xilacina 1 ml; Atropina 0,1 ml ; Sol. Salina 4,3 ml. La solución se ha utilizado mediante inyección i.p. a la dosis de 0,1 ml/ 25 g. de peso rata.
- **Suero fetal bovino**(GIBCO BRL, Gaithersburg, E.E.U.U.)

4.2 Métodos

4.2.1 *Animales: anestesia, tratamiento, eutanasia*

4.2.1.1 *Anestesia de los animales*

Los animales han sido anestesiados mediante inyección intraperitoneal de solución anestésica, compuesta por ketamina, 10mg/kg; xylazine, 30 mg/kg; atropina, 0.05 mg/kg. diluida en cantidad suficiente de solución salina, para obtener un volumen de inyección de 0,1 ml / 25 g. de peso

4.2.1.2 *Administración de BrdU*

A todos los animales sometidos a ensayo se les ha administrado BrdU (5-bromo-2deoxyuridine). Dosis de 50 mg/kg en solución salina isotónica estéril, vía intraperitoneal, dos horas previas a la eutanasia.

4.2.1.3 *Administración de células MSCs*

A todos los animales que recibieron tratamiento coadyuvante con terapia celular se les inóculo por vía intravenosa en la vena lateral de la cola 500.000 células rMSCs de rata macho suspendidas en solución de PBS en un volumen de 0,5 ml.

Las células mesenquimales procedentes de la rata fueron suministradas por JP García-Ruiz, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Facultad de Ciencias, Univ. Autónoma de Madrid.

4.2.1.4 Eutanasia de los animales

Los animales fueron sacrificados en los distintos periodos de tiempo establecidos para cada gupo con CO₂, empleando procedimientos humanitarios de acuerdo a la Directiva (86/609/CEE) y al RD 223/1988.

Los animales empleados en la obtención de células o extracción de la placa de crecimiento para su utilización en los cultivos fueron sacrificados por decapitación.

Las extremidades anteriores se seccionaron, se separaron los músculos y tendones para dejar el hueso limpio y se introdujeron en buffer formalina para su posterior estudio radiológico e histológico. Ambas extremidades superiores se radiografiaron a los 2-3 días de realizada la autopsia, antes de proceder a su descalcificación.

La eliminación de restos biológicos se realizó cumpliendo la reglamentación de tratamiento de Residuos Biosanitarios del gupo III, a través de la empresa ECOCLINIC ATHISA

4.2.2 Método de extracción de células y cultivos

4.2.2.1 Extracción de células MSCs

Para la extracción de las células mesenquimales del tejido hematopoyético, MSCs, se usaron ratas Sprague Dawley macho de 15 a 21 días de edad.

Tras la eutanasia, se extrajeron bajo condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar con mechero de gas incluido, y condiciones de asepsia en todo el material usado, los huesos tubulares tales como el fémur y la tibia.

Los huesos se liberaron de las inserciones tendino-musculares y del periostio mediante raspado con hoja de bisturí (nº 11). A continuación se practicó osteotomía del hueso y a continuación extracción del tejido de médula ósea.

El tejido medular se colocó en una placa Petri con medio de cultivo. En días sucesivos se extrae el medio y las células muertas flotantes. En el fondo, adheridas a la placa van surgiendo colonias celulares que según su tipología se definen como colonias de células MSC.

4.2.2.2 Cultivo de células mesenquimales

Las células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma), 2mM de glutamina, 400 μ M de aminoácidos no esenciales, 0,01% de estreptomina, 0,06% de penicilina G y 50 μ g/ml de gentamicina. 1 g de glucosa por litro, más suero seleccionado para estas células. Los cultivos primarios fueron mantenidos a 37°C, 7% de CO₂ y 97% de humedad relativa, con cambios de medio cada 2 ó 3 días, seleccionando los clones adherentes al plástico.

Durante el crecimiento de las células el medio fue reemplazado dos veces por semana, una vez conseguida la expansión las células fueron despegadas con solución de EDTA-tripsina, resuspendidas en DMEM básico y congeladas en nitrógeno líquido con un 10 % de DMSO para posteriores estudios.

4.2.2.3 Diferenciación condrogénica de células MSC

La inducción a la diferenciación se realizó mediante cultivo de más de 200.000 células en 0,5 ml, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con, 2mM de glutamina, 400 μ M de aminoácidos no esenciales, 0,01% de estreptomina, 0,06% de penicilina G y 50 μ g/ml de gentamicina, 625 μ g/mL of insulina, 625 μ g/ml de transferrina, 625 ng/ml of selenito sódico, 125 mg/ml of albumina de suero, 50 μ M ácido ascórbico, 100 nM dexametasona y 10 ng/ml de TGF- β . Durante la expansión de las células (15-20 días) el medio fue reemplazado tres veces por semana, una vez conseguida la expansión las células fueron despegadas con solución de EDTA-tripsina, se resuspendieron en PBS con suero para inactivar la tripsina centrifugando 5 minutos a 600g, se resuspendieron en PBS dos veces mas centrifugando de igual forma. Las células fueron contadas en hemocitómetro con azul tripán (dilución 1:50) y ajustadas a una concentración final de 1×10^6 células /ml

4.2.2.4 Extracción de condrocitos

Extracción de la zona germinativa: Los condrocitos fueron extraídos de la zona germinativa y lavados con GBSS. Decantar el GBSS y añadir 0.25 ml de hialuronidasa al 0,5% en GBSS, digerir 5 min. a temperatura ambiente. Decantar la hialuronidasa y añadir 0.5 ml de solución fresca de hialuronidasa al 0.5% y digerir durante 10 min. Decantar la solución y lavar dos veces con 0.5ml de GBSS. Lavar con 0.25 ml de tripsina al 0.2% en GBSS. Incubar el tejido con 0.5ml de tripsina al 0.2% a 37°C durante 30 min con agitación. Decantar la tripsina y lavar en GBSS a temperatura ambiente. Lavar los fragmentos durante 5 min con 0.25 ml de colagenasa al 0.2% en GBSS. Decantar la colagenasa de lavado. Incubar el tejido con colagenasa al 0.2% durante 30 min a 37°C. Quitar el sobrenadante. añadir de nuevo colagenasa al 0.2% e incubar a 37°C durante 90 min.. Centrifugar a 600 g durante 8 min, quitar el sobrenadante. Resuspender las células en PBS y centrifugar a 180 g, 1 min para que sedimenten las partículas no digeridas. Pasar el sobrenadante a otro tubo y centrifugar a 600 g, 10 min para que sedimenten las células. Resuspender las células en PBS.

4.2.2.5 Cultivo de condrocitos

Cuando fue necesario los condrocitos fueron mantenidos en cultivo en medio DMEM. A 100 de DMEM se añade 2ml de glutamina 50X, 2ml de Hepes 0.75 M, 0.2ml de kanamicina, 0.5ml de nistatina, 1ml de penicilina/estreptomicina, 10 ml de suero de ternera fetal, 1ml de ácido ascórbico (150 mg cada 10 ml). Se resuspenden las células en 1ml y se colocan en los pocillos en la cámara de cultivo.

4.2.3 Métodos de estudio histológico

4.2.3.1 Procesamiento descalcificación e inclusión en parafina

Las piezas tras la extracción se fijaron en buffer formalina al 7%, durante 3 días, a continuación fueron introducidas en solución de ácido fórmico al 7 % durante 5-10 días, verificando su correcta descalcificación. Las piezas se tallaron, se lavaron en agua desionizada y se deshidrataron en etanol de concentraciones crecientes, 70°, 96°, 100°, terminando en acetato de butilo. La inclusión en parafina se realizó en estufa de cultivo a 60 °C, en 3 pasos durante un tiempo total de 2 horas. Los bloques fueron montados orientando cada pieza según la sección tallada, realizando a continuación cortes histológicos de 5-7 µm

4.2.3.2 Tinción de hematoxilina eosina

Es la tinción más básica y utilizada para ver las estructuras celulares. La hematoxilina es un colorante del núcleo celular, que lo tiñe de azul intenso. La contratinción se realizó con eosina, un colorante débilmente ácido que colorea el citoplasma, el tejido conjuntivo y las fibras de colágeno de rojo intenso. (Fig 4.2.1)

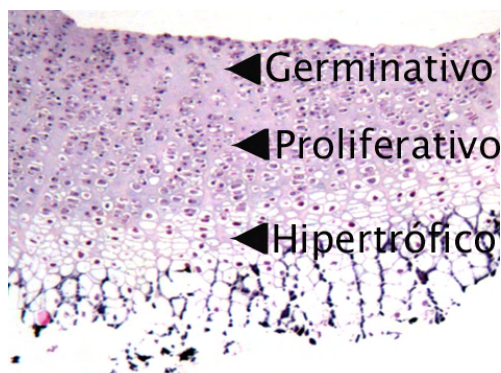


Imagen 4.2.1. Placa de crecimiento 4x tinción HE (Hematoxilina eosina)

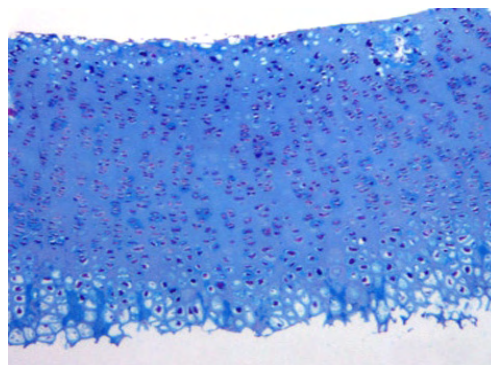


Imagen 4.2.2. Placa de crecimiento 4x tinción AA (azul-Alcian)

Los portas con los cortes de parafina se introducen: Estufa a 60°C, mínimo 30'; máximo 2 h. Xilol: 2 x 15'. Etanol de concentraciones decrecientes 100 °, 96°, 70° : 5'/ cada. Agua destilada: lavar. Hematoxilina de Carazi: 10'. Agua destilada: 2 lavados. Eosina : 1,5'. Etanol de 70°: 5'. Etanol de 96° : 2 x 5'. Etanol de 100°: 2 x 5'. Xilol: 2 x 5'. Montar con DPX

4.2.3.3 Tinción de Azul-Alcian PAS

Es una tinción que permite ver componentes celulares, facilitándonos la histoquímica de glúcidos. El Glucógeno es un polisacárido que se encuentra en numerosos tejidos. PAS (ácido periódico de Schiff) revela la presencia de polisacáridos (glucógeno, almidón y celulosa) y glucosaminoglicanos neutros (mucinas). El reactivo de Schiff (fucsina básica decolorada con ácido sulfuroso) reacciona con aldehídos libres del tejido formando una estructura compleja, que se oxida y da color rosa debido a la fucsina. Azul Alcian: es un colorante tetracationico que se ha usado para la cuantificación de glicoconjugados.

La tinción combinada permite distinguir los polisacáridos ácidos de los neutros. Al teñir los polisacáridos ácidos de azul alcian, aquellos que pudieran ser PAS+ no reaccionan con la subsiguiente reacción PAS y solo lo harán los neutros. En el citoplasma los gránulos de glucógeno PAS+, se revela en magenta por el reactivo de Schiff's. El método combinado AB/PAS revela la presencia de gránulos en las células (Cerri et al. 2003) Los gránulos AB+ aparecen de color azul-turquesa mientras que los PAS+ aparecen de color magenta, los gránulos que fueron positivos para ambos y se muestran en color púrpura. (Fig 4.2.2)

Los portas con los cortes de parafina se introducen: Estufa a 60°C, mínimo 30', máximo 2 h. Xilol: 2 x 15'. Etanol de concentraciones decrecientes 100 °, 96°, 70° : 5'/ cada. Agua destilada: 10'. Azul alcian al 1 % : 10'. Agua destilada :10'. Agua destilada: 2 x 5'. Ácido periodico: 10'. Agua destilada: 2 x 3'. Reactivo de Schiff: 15' . Bisulfito sódico: 5'. Agua destilada: 2 x 5' .Hematoxilina de Carazi: 5'. Agua destilada: 2 lavados. Agua destilada:10' Etanol de 70°: 5'. Etanol de 96° : 2 x 5'. Etanol de 100°: 2 x 5'. Xilol: 2 x 5'. Montar con DPX

4.2.3.4 Inmunohistoquímica para el estudio del ciclo celular: BrdU

Las células activas en síntesis de DNA, células en fase S, pueden ser específicamente marcadas *in situ* por la incorporación de BrdU en el nuevo DNA que están sintetizando

La inmunotinción de células en ciclo celular (BrdU+) se realizó de acuerdo un método ya descrito (Martos-Rodriguez et al 2003) con un sistema ZYMMED LAB-SA. Se usó anti-BrdU (mAb+nuclease, como solución de trabajo; Amersham biosciences UK Ltd, Little Chalfont, UK) como primer anticuerpo, e inmunoglobulina biotinilada anti-conejo como

segundo anticuerpo (ZYMED), seguida de estreptavidina peroxidasa. Los antígenos fueron revelados después de la reacción con diaminobencidina y H_2O_2 . La contra-tinción del núcleo se realizó con hematoxilina. Los pasos fueron: Desparafinar e hidratar; H_2O_2 al 3 % 10'; PBS 2 x 5'; Tripsina al 0,1% a 37°C 5'; PBS 5'; CIH 0,5N 30'; PBS 2 x 5'; Suero de bloqueo 15'; Anticuerpo 1° 60'; PBS 2 x 5'; Anticuerpo 2° biotinilado 15'; PBS 2 x 5'; Streptavidina 15'; PBS 2 x 5'; Diaminobencidina controlando el revelado; PBS 2 x 5'; Agua destilada 5'; Hematoxilina 5'; Agua destilada 5'; Deshidratar y montar

4.2.4 Valoración por transiluminación “ex vivo”

4.2.4.1 Valoración de la placa de crecimiento normal

Como técnica previa al cultivo se realizó una aproximación experimental para estudiar la morfología de la placa de crecimiento distal del radio de la rata de 10 y 15 días de edad, ya que dicha placa ha sido el material de ensayo empleado posteriormente en cultivos y trasplantes. El estudio previo se han realizado mediante una nueva técnica de transiluminación “ex vivo”.

Se anestesiaron los animales y se les extrajo la placa de crecimiento distal del radio mediante el empleo de lupa estereoscópica con transiluminación. Cada placa se cortó con ayuda de una cuchilla de afeitar en secciones verticales menores de 1mm de grosor y mayores de 0.5 mm. Cada corte incluye zona del germinativo, zona del proliferativo e hipertrófico. La mitad de las secciones cortadas se colocaron en un porta excavado con solución de PBS y se valoraron “ex vivo” mediante transiluminación por microscopia óptica. La otra mitad de las secciones cortadas se procesaron para cortes histológicos y tinción de HE.

El parámetro a valorar ha sido el fenotipo celular. Con esta técnica se pretendía un estudio precoz de la morfología de la placa y del fenotipo de las células previo a que sufrieran los artefactos conocidos en los procesamiento histológicos, así como la posibilidad de usarlas en futuros estudios. Los métodos aplicados en este ensayo y en los sucesivos para el estudio histológico, procesamiento, cortes, tinciones etc., se exponen en los métodos de estudio histológico.

4.2.4.2 Valoración de la mortalidad celular

Se utilizó la placa radial distal de ratas de 11-15 días, que se cortaron igualmente en secciones verticales según técnica citada en los párrafos previos. La mitad de las secciones de cada placa se colocaron en un porta excavado y se cubrieron con solución PBS.

Se valoraron ambas secciones mediante microscopia óptica, tinciones “ex vivo” e histología convencional desde los 0 minutos hasta las 6 horas después de mantenidas con solución Ringer. Cada 30 minutos se extrajeron 3 placas y se tiñeron con Trypan Blue. Con

esta tinción se pretendía estudiar la mortalidad celular presente en la placa de crecimiento en los tiempo de transición desde su extracción a la realización de los ensayos planteados.

En todos los casos, tras la tinción con la ayuda de un microscopio de transiluminación y con objetivo de 20X se contó el mayor número de células de la zona del proliferativo y de la zona del hipertrófico, haciendo referencia al porcentaje de células Trypan Blue positivas y negativas. Como criterio de inclusión se consideró las células teñidas de azul oscuro en un campo de visión. Se consideró criterio de exclusión aquellos cortes en los que existía la posibilidad de un corte oblicuo.

El azul tripan es un colorante aniónico del grupo de los colorantes azóicos y se usa como colorante para tinción vital. El azul Tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan rotura en la membrana. Así pues, las células que aparecen en la imagen, claramente de color azul, son consideradas no viables.

4.2.5 Cultivo de placa de crecimiento “in vitro”

4.2.5.1 Cultivos simples

Se utilizaron ratas SpragueDawley de 8 días con un peso de 12-14 g. Tras la eutanasia se les extrajo la tibia y mediante el empleo de lupa estereoscópica con transiluminación se extrajo la placa.

La placa se seccionó primero en sentido longitudinal. Se cortaron 2 casquetes polares y 3 secciones centrales C-1, C-2 y C-3 (Fig 4.2.3)

A continuación, cada sección central se dividió en dos partes germinativo y proliferativo, eliminando una pequeña lamina entre ambas zonas como zona indefinida para asegurarnos que en cada sección cultivada tenemos solo germinativo en un caso y proliferativo en el otro. (Fig 4.2.4)

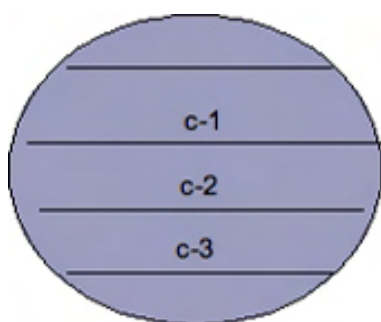


Imagen 4.2.3. Esquema de los cortes realizados

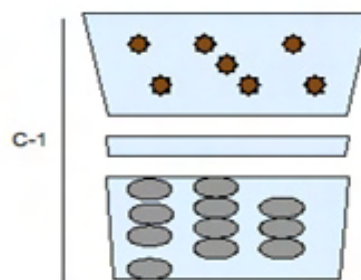


Imagen 4.2.4. Esquema de separación de las secciones

Material y Métodos

En todos los casos se realizaron medidas con microscopio, objetivo de 20x, y ocular milimetrado de todas las piezas diseccionadas antes del cultivo, a la vez que se verificaba microscópicamente su correcta separación en germinativo y proliferativo e hipertrófico. (Fig 4.2.5 y 4.2.6) Previo al cultivo, dado que las piezas no presentaban una forma rectangular exacta, se realizaron entre 5-7 medidas para valorar el alto de la pieza y entre 2-3 medidas para la valoración de largo. Los resultados tabulados para cada caso corresponden a los promedios de estas medidas.

Para evitar la desecación del tejido durante la observación microscópica, las piezas se depositaron en un porta excavado, manteniendo en todo momento la humedad del tejido con PBS.

Se practicaron dos formas distintas de cultivo:

- cultivo simple de cada zona de la placa de crecimiento separadas.
- co-cultivos de ambas zonas germinativa y proliferativa.

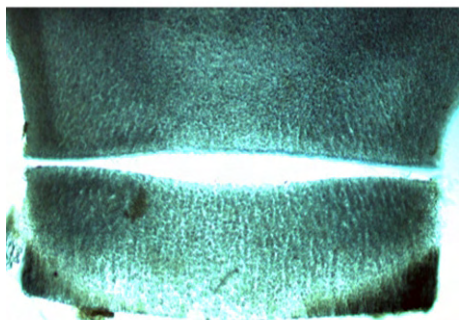


Imagen 4.2.5. Secciones de germinativo y proliferativo 4x TI

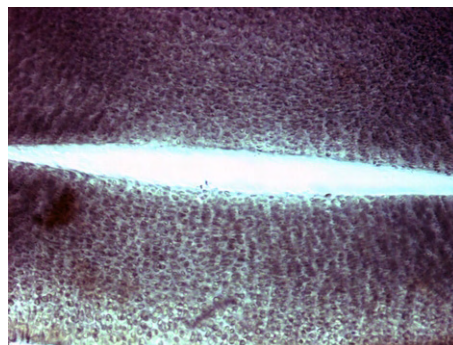


Imagen 4.2.6. Secciones de germinativo y proliferativo 10x TI

Los tejidos de cultivo se manejaron en cabina de flujo laminar. Las piezas fueron colocadas en una placa Nuclon de 24 pocillos. Se colocaron en unos pocillos germinativo solo, en otros pocillos proliferativo solo y en otros se colocaron en el mismo pocillo ambas piezas separadas como se ha descrito.

Todas las piezas fueron cubiertas con 1 ml de medio de cultivo. Como medio de cultivo se utilizó DMEM-INS y DMEM-INS-TGF, se emplearon ambos medios en todos los casos para valorar el crecimiento de las piezas con uno u otro. Las piezas permanecieron en un incubador con un 5 % de CO₂ durante 3 días, transcurridos los cuales se valoraron por transiluminación directa (TI) mediante microscopía óptica, se volvieron a medir y posteriormente fueron incluidas en parafina para su estudio histológico mediante tinciones.

Los parámetros a valorar han sido la histometría de la pieza de cultivo, la arquitectura tisular, y los fenotipos tisulares de los cultivos.

4.2.6 Injerto de placa de crecimiento en cápsula renal

Como ensayo previo a los trasplantes de placa, y estudio a corto plazo para en el planteamiento del procedimiento quirúrgico, en cuanto a conservación o no del anillo pericondral, se realizaron previamente una serie de injertos heterotópicos de la placa en cápsula renal del riñón del receptor.

El injerto en cápsula renal es un método de crecimiento in vivo que se ha empleado para el crecimiento de órganos y embriones. El riñón es uno de los órganos más vascularizados y permite al tejido injertado alcanzar la expresión de su morfogénesis, diferenciación y función (Brody et al. 1998).

4.2.6.1 Tipos de injertos

Se practicaron 6 tipos de injertos: Se injertó: Placa simple, placa con anillo, germinativo solo, germinativo con anillo, proliferativo solo, y proliferativo con anillo.

- En un grupo se injerto la placa entera con el anillo pericondral respetado
- En otro grupo se injerto la placa desprovista de su anillo.

El injerto permaneció en el receptor durante un periodo de 14 días. Transcurrido este tiempo el riñón fue extraído del receptor y el injerto se retiró de la cápsula. Se adquirieron imágenes de la placa en el momento de su extracción por transiluminación directa (TI) mediante microscopia óptica y posteriormente las piezas fueron incluidas en parafina para su estudio histológico mediante tinciones.

4.2.7 Resección de zonas e interposición de membrana

4.2.7.1 Tipos de ensayos

- **Primer ensayo:** Ensayos en zona germinativa. sobre placa de crecimiento distal de radio
 - Grupo 1. Se realizó únicamente extracción de la zona germinativa. Tiempo se seguimiento 10 días.
 - Grupo 2. Extracción de la zona germinativa, colocación de esponja de colágeno con medio DMEM.
 - Grupo 3. Extracción de la zona germinativa, colocación de esponja de colágeno más 10 µl de medio de cultivo de condrocitos procedentes del germinativo.
 - Grupo 4. Inyección sobre el germinativo de medio de cultivo de condrocitos
 - Grupo 5. Inyección en la zona germinativa de medio DMEN

Material y Métodos

- Grupo 6. Traumatismo simple en la zona germinativa mediante la punción simple con aguja.
- **Segundo Ensayo:** Resección de la zona germinativa y sustitución por membrana de 0,22 μm de poro.
- **Tercer ensayo:** Sección transversal de la placa de crecimiento y colocación de membrana de 0,22 μm .
- **Cuarto ensayo:** Colocación de membrana de 0,22 μm entre zona proliferativa y zona hipertrófica.

En estos ensayo los parámetros a valorar son los cambios fenotípicos celulares que ocurren en la zona de ensayo o en la zonas próximas.

4.2.7.2 Técnicas empleadas en la interposición de membrana

Técnica extracción de la zona germinativa:

Se utilizaron ratas de 12 a 15 días. Se anestesiaron los animales y se les desinfectó el campo quirúrgico. Bajo lupa estereoscópica con transluminiscencia y epiluminiscencia se practica una incisión cutánea en la cara externa de la región distal del radio izquierdo, continuando con separación de piel y tejido subcutáneo y separación de los tendones del primer dedo. Por transluminación, se identifica la placa de crecimiento y el centro secundario de osificación. Se practica una incisión longitudinal sobre pericondrio. Con un bisturí ocular se practica una sección transversal por debajo del centro de osificación secundario, y otra sección sobre placa de crecimiento en la mínima distancia posible. Se extrae la zona germinativa y se cierran planos y piel con sutura de 6-0. La zona de germinativo extraída se procesó en histología convencional para su confirmación.

Colocación de esponja de colágeno:

Se realizó con técnica similar a la anteriormente descrita. Una vez resecada la zona de interés se coloca una cantidad de esponja de colágeno que ocupe toda la zona de extracción.

Inyección de medio de cultivos en la zona germinativa:

Se practicó con el animal anestesiado, se accedió y localizó la placa de crecimiento por transluminación como se ha indicado anteriormente y con aguja de insulina se pinchó directamente la zona germinativa.

Colocación de membrana de 0,22 μ m

Con la misma técnica de anestesia y cirugía se descubrió la placa de crecimiento y tras apertura de la zona de interposición con material de microcirugía se introdujo la membrana, previamente cortada al tamaño oportuno, en el lugar señalado. Se cerraron planos y piel con sutura de 6-0.

4.2.8 Trasplante alogénico ortotópico avascular de placa de crecimiento

Con objeto de estudiar el comportamiento de la placa “in vivo”, se realizaron alotrasplantes de la placa distal del radio de la rata. Por razones técnicas en los trasplantes se utilizó la placa del radio, ya que esta extremidad es de menor apoyo en el animal y nos permitió una mejor inmovilización tras la intervención quirúrgica.

4.2.8.1 Grupos de ensayo

Los animales se distribuyeron en series de ensayos agrupados por método quirúrgico, series y grupos.

- Método quirúrgico E. trasplante de placa de crecimiento sola
- Método quirúrgico J. trasplante de placa de crecimiento con metáfisis

Dentro de cada método quirúrgico se realizaron varias series en función del tratamiento coadyuvante con terapia celular.

- Serie EC. Sin tratamiento celular
- Serie E0. Células MSC en el momento del trasplante
- Serie E15. Células MSC a los 15 días del trasplante
- Serie JC. Sin tratamiento celular
- Serie J15. Células MSC a los 15 días del trasplante

Cada serie se dividió en grupos donde se estudiaron los cambios y evolución de la placa de crecimiento trasplantada a las 6, 12 y 24 semanas post-trasplante.

- Ensayos grupo 1: valoración a las 6 semanas del trasplante
- Ensayos grupo 2: valoración a las 12 semanas del trasplante
- Ensayos grupo 3: valoración a las 24 semanas del trasplante

La nomenclatura empleada para la denominación de los casos fue por ej: E0.1.3 indicando consecutivamente, la cirugía practicada, el tratamiento celular, el tiempo y el caso.

4.2.8.2 Procedimiento quirúrgico

Las condiciones establecidas para la realización de los trasplantes fueron:

- Ratas Sprague Dawley
- Trasplante siempre de placa macho a hembra.
- Se opera en todas la extremidad superior izquierda.
- Ratas de 15 días de edad, tanto donante como receptor.
- Se transplanta la placa del radio con su anillo pericondral.

Toda la intervención se realiza mediante microcirugía bajo lupa estereoscópica con epiluminiscencia y transluminiscencia. (Fig 4.2.7 a 4.2.15)

Intervención en el animal receptor.

Para la extracción de la placa de crecimiento se realizaron los siguientes pasos: Rata hembra con anestesia general. Tratamiento de la piel de la extremidad anterior izquierda con un antiséptico cutáneo convencional. Colocación del animal en decúbito supino. En la región distal del antebrazo izquierdo, a nivel de la cara externa de la muñeca se practica incisión cutánea longitudinal de 0,5 mm de longitud.

Disección de los planos subcutáneos. Separación por disección roma de la red vascular de esta región, que se separan hacia la región volar de la muñeca. Localización de los tendones del músculo abductor y músculo extensor del primer dedo. Se localiza la placa de crecimiento por transiluminación. Con instrumentación de microcirugía se practica sección transversal horizontal a la placa de crecimiento, en la zona proximal, sobre el plano condrometáfisario. Sección transversal en la zona distal de la placa de crecimiento por debajo del centro de osificación secundario. Extracción de la placa de crecimiento con el anillo pericondral incluido. A continuación se deja colocada en el lecho una pequeña gasa para impedir hematomas secundarios a la intervención y retracción del lecho. Extraída la placa de crecimiento del donante, ésta se coloca en el lecho preparado del receptor, en la misma posición anatómica. Las partes blandas se cierran con un punto de aproximación con sutura de 7-0. Se coloca antibiótico local y se cierra la piel con sutura de 3-0.

Extracción de la placa de crecimiento con hueso metafisario: Intervención similar a la anterior. La sección proximal se realiza en metáfisis aproximadamente a 1.5 mm del plano

metafisario de la placa de crecimiento.

Tras la intervención, en ambos caso, se coloca una férula tubular de material plástico en la extremidad intervenida, esta férula se fija en la piel y se retira en el plazo de una semana. Los animales se mantienen durante el periodo post-operatorio debajo de una fuente calor, cuando se despiertan se colocan de nuevo en su jaula.



Imagen 4.2.7. Incisión cutánea en cara externa de 0,5 cm

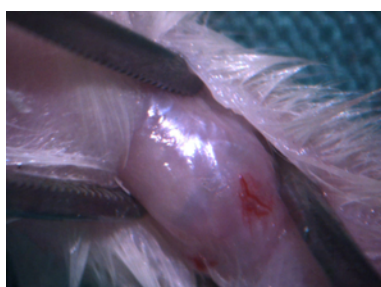


Imagen 4.2.8. Disección de planos subcutáneos

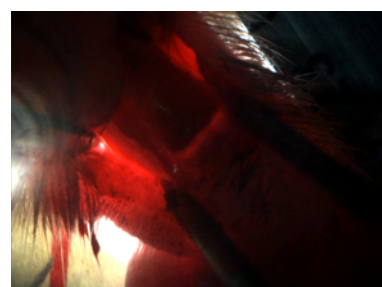


Imagen 4.2.9. Localización por transiluminación



Imagen 4.2.10. Placa descubierta por transiluminación



Imagen 4.2.11. Placa descubierta por epi-iluminación

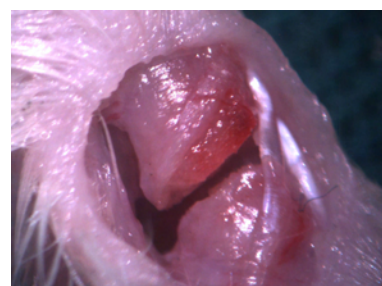


Imagen 4.2.12. Lecho de la placa extraída



Imagen 4.2.13. Placa extraída (regla divisiones. en mm)

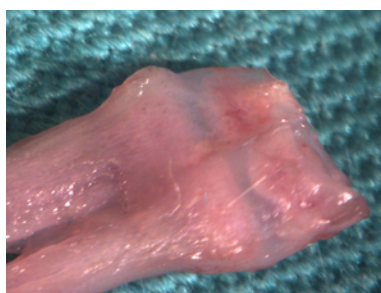


Imagen 4.2.14. Placa visualización por epi-iluminación

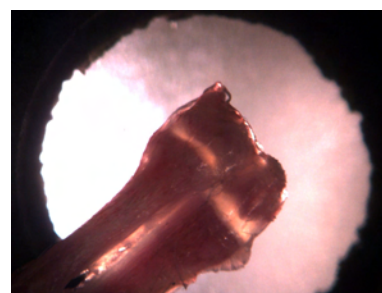


Imagen 4.2.15. Placa visualización por transiluminación

Intervención en el animal donante.

Se realiza en ratas macho. Se practica la misma técnica quirúrgica. En la extracción de la placa del donante es importante mantener el anillo pericondral y la posición anatómica de la placa para evitar inversión de la placa cuando se coloca en el lecho del receptor.

4.2.9 Estudio Radiológico

Las piezas de ambas extremidades superiores del animal, trasplantada y control, fueron aisladas, respetando la articulación del codo, con objeto de poder medir en radiografía la longitud de los huesos además de otras variables.

En el aparato de Rx Faxitron, se practicaron las radiografías con una intensidad de 20 mkv y tiempo de exposición de 20 seg. Las extremidades se colocaron en posición anteroposterior.

4.2.9.1 Valoración cualitativa

La placa de crecimiento en el estudio radiológico se observa por aparecer radiotranslúcida. (Fig 4.2.16)

Se realizó una valoración cualitativa de luxaciones, desviaciones y malposiciones de la articulación implicada, cubito, radio, fisis, epífisis y metacarpo, con atención especial a las anomalías mostradas por la fisis. Esta valoración cualitativa se realizó sobre la radiografía de la extremidad trasplantada mediante el empleo de lupa estereoscópica con transiluminación.

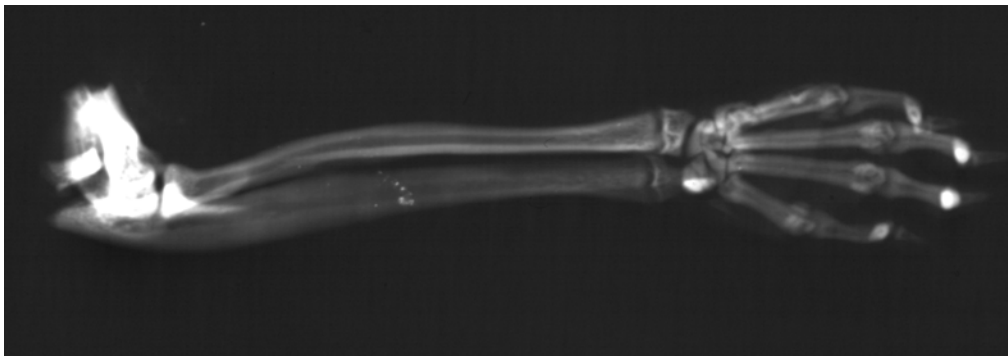


Imagen 4.2.16. Imagen radiológica de la articulación

4.2.9.2 Valoración cuantitativa

Se realizó una valoración cuantitativa de la evolución de los trasplantes a diferentes tiempos, realizando una serie de medidas comparativas de la articulación trasplantada y la articulación control.

La valoración se realizó tomando una serie de medidas sobre las radiografías de cada hueso y estructura ósea: cúbito, radio, placa de crecimiento y epífisis (Esquema de las mediciones realizadas en Fig 4.2.17 a 4.2.20)

Las variables medidas fueron:

- Longitud del cúbito (LC): medida desde la apófisis del olecranon a la apófisis estiloides.
- Longitud del radio (LR): medida desde la cabeza del radio a la tuberosidad radial.
- Longitud del eje proximal del radio (LPR): medida por la línea perpendicular al plano articular de la cabeza del radio prolongada distalmente en su trayecto diafisario hasta traspasar la cortical de la diáfisis del radio.
- Longitud del eje distal del radio (LDR): medida por la línea perpendicular al plano de la superficie articular distal del radio prolongada a proximal en su trayecto diafisario hasta que traspasa la cortical diafisaria del radio.
- Longitud de la fisis o placa de crecimiento radial externa (LPE): medida por la línea que une el borde proximal externo de la epífisis del radio con el borde distal externo de la metáfisis del radio.
- Longitud de la fisis radial media (LPM): medida por la línea perpendicular en el tercio medio de la placa de crecimiento entre el plano radiológico distal de la metáfisis y el plano radiológico proximal de la epífisis.
- Longitud de la fisis radial interna (LPI): medida por la línea que une el borde proximal interno de la epífisis del radio con el borde distal interno de la metáfisis del radio.
- Longitud de la epífisis radial externa (LEE): medida por la línea que recorre el borde externo de la epífisis del radio.
- Longitud de la epífisis radial interna (LEI): medida por la línea que recorre el borde interno de la epífisis del radio.
- Anchura de la diáfisis radial (ADR): medida por una línea trazada en el tercio medio del radio perpendicular a ambas corticales.
- Anchura de la metáfisis radial (AMR): medida por una línea perpendicular a la metáfisis en la zona más próxima a la fisis o placa de crecimiento.
- Anchura de la fisis proximal (APP): medida por la línea trazada horizontal a la placa de crecimiento en su plano proximal y corta ambos bordes.
- Anchura de la fisis distal (ADP): medida por la línea trazada horizontal a la placa de

Material y Métodos

crecimiento en su plano distal y corta ambos bordes.

- Anchura de la epífisis media (AEM): medida por la línea trazada horizontal a la epífisis distal del radio en su tercio medio y corta ambos bordes.
- Angulo metafisario (GDR): formado por los ejes longitudinales proximal y distal en la metáfisis del radio.
- Angulo diáfisis / eje fisis transversal (GDT) formado por el eje longitudinal de la diáfisis con el eje transversal medio de la fisis.
- Angulo diáfisis / epífisis (GDE) formado por el eje longitudinal de la diáfisis con el eje transversal medio de la epífisis radial.

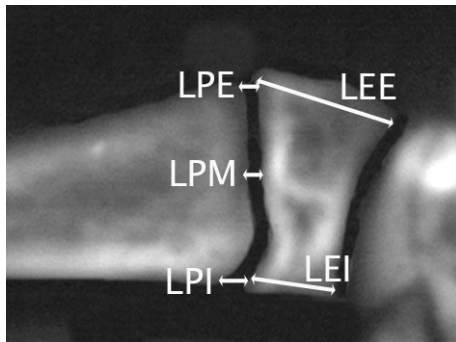


Imagen 4.2.17. Esquema de las variables de longitud

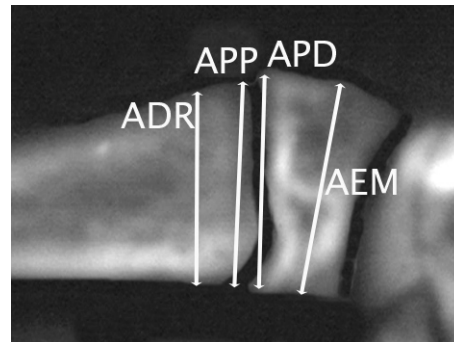


Imagen 4.2.18. Esquema de las variables de longitud

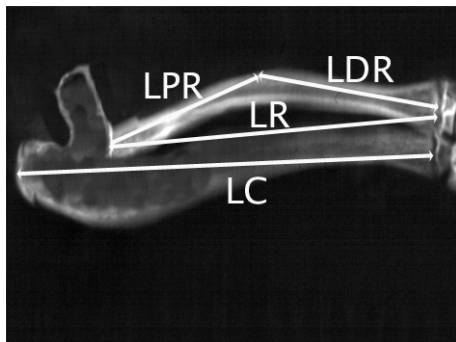


Imagen 4.2.19. Esquema de las variables de anchura

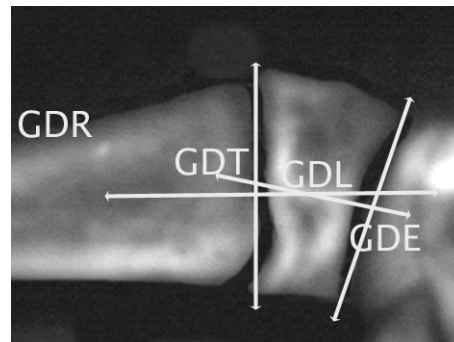


Imagen 4.2.20. Esquema de las variables angulares

Las radiografías fueron escaneadas y se realizaron mediciones lineales y angulares con el programa “ImageJ” del National Institutes of Health, USA. Todas las medidas tomadas están expresadas en medidas reales, la escala radiológica es 1:1. Las medidas de longitud están indicadas en mm y las angulares en grados.

Se realizó un análisis estadístico de las series de medidas mediante la prueba t de

Student para comparar el nivel de significación de la diferencia entre las muestras, para una probabilidad de 0,05 y n-1 grados de libertad. Si t calculada $< t$ tabulada, se acepta que no es significativa la diferencia entre las muestras.

4.2.10 Estudio Histológico

El estudio histológico de la placa de crecimiento trasplantada se ha realizado sobre los cortes teñidos con hematoxilina-eosina, las lesiones se han valorado y puntuado de forma independiente para cada caso de acuerdo con la tabla 4.2.2. Se han valorado la estructura de la placa, las columnas, la celularidad, la matriz, el anillo pericondral, la interacción de la placa con la epífisis y con la metáfisis, la presencia de osificaciones anormales y la respuesta inflamatoria del huésped.

En la estructura y columnación y osificación se ha introducido un factor multiplicador en la valoración según la zona afectada:

- Zona central afectada $F=1$
- Zona periférica afectada $F=2$
- Ambas zonas afectadas $F=3$

El índice de Respuesta (IR) nos da la suma de los valores obtenidos en cada zona. Valor máximo posible: 38

Con objeto de poder agrupar los resultados obtenidos en cada serie de ensayos, se ha establecido un índice de clasificación de respuesta histológica. Teniendo en cuenta el valor máximo posible de afección y el promedio de puntuación obtenido en cada grupo de ensayos se obtiene una clasificación del índice de respuesta del grupo de acuerdo con la tabla 4.2.1.

Tabla 4.2.1 Clasificación de la respuesta

IR	Clasificación	En porcentaje
0 – 5	Normalidad	$< 14 \%$
6 – 11	Alteración discreta	15 % - 30 %
12 - 22	Alteración intensa	31 % - 59 %
> 23	Alteración completa	$> 60 \%$

Tabla 4.2.2 Cuantificación de las lesiones de las diversas zonas afectadas

Parámetro afectado	Reacción	Puntuación
Estructura	Normal	0
	Discontinuidad en alguna zona	1
	Daño parcial en alguna zona	2
	Desorganización completa	3
Columnas	Normales	0
	Alteración en hipertrófico	1
	Alteración en proliferativo	2
Celularidad del germinativo	Normal	0
	Hipercelularidad	1
	Hipo celularidad	2
Celularidad del proliferativo	Normal	0
	Hipercelularidad	1
	Hipo celularidad	2
Celularidad del hipertrófico	Normal	0
	Hipercelularidad	1
	Hipo celularidad	2
Matriz	Normal	0
	Hipocromica	1
	Fibrilación	2
	Discontinuidad	3
Anillo pericondral	Normal	0
	Hipertrofia	1
	Atrofia	2
Unión con epífisis	Normal	0
	Alteración parcial	1
	Alteración completa	2
Unión con metáfisis	Normal	0
	Alteración parcial	1
	Alteración completa	2
Puentes fisarios	Ninguno	0
	Puente fibroso	1
	Puente oseo	2
Infiltrado inflamatorio	Ninguno	0
	Moderado	1
	Abundante	2

5 Resultados

5.1 Resultados técnica de transiluminación

5.1.1 Valoración de la placa de crecimiento

En el curso de los trabajos de investigación realizados en nuestro laboratorio se plantean numerosas preguntas, algunas de ella de mucha simplicidad ¿cómo es realmente la celularidad de la placa de crecimiento? Los métodos usuales proceden del campo de la histología, lo que implica un procesamiento de los tejidos acompañado de una gran distorsión. El problema consistía en evitar los procedimientos que distorsionan y artefactan el tejido.

El método de valoración que presentamos se debe a Antonia Martos Rodríguez, un miembro del laboratorio. La técnica, aun en curso de validación, permite valorar “ex vivo” algunos aspectos morfológicos de la placa de crecimiento en visión directa.

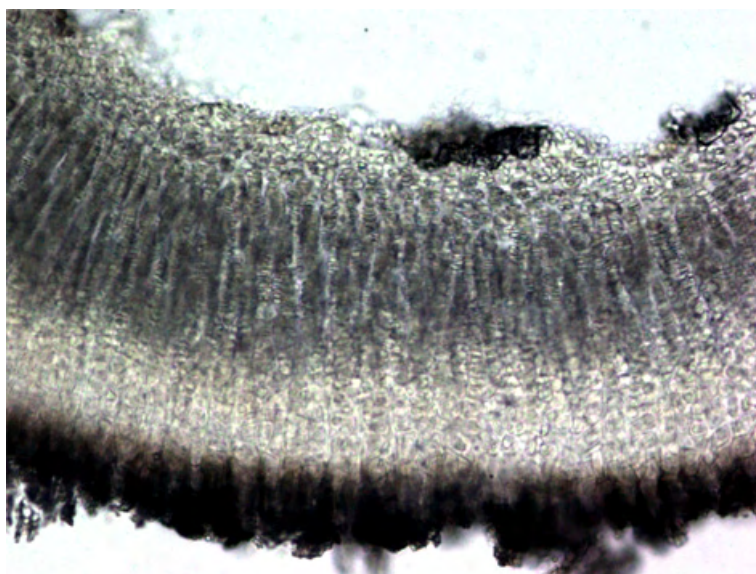


Fig 5.1.1. Placa de crecimiento completa “ex vivo” visión directa 4x

En las secciones frontales de la placa de crecimiento, en fresco, realizadas con cuchilla de afeitar, bajo lupa estereoscópica, se obtienen cortes de diferente grosor y difíciles de medir con nuestros medios. Normalmente se obtienen dos tipos de cortes: unos cortes completos de toda la placa, de 1 mm de grosor o menores; otros, cortes realizados con ligera oblicuidad, lo que permite extraer secciones en cuña. Las secciones en cuña permiten una

Resultados

visión mas completa de las áreas del tejido en el vértice de la cuña, apreciándose en ocasiones en esta zona hasta columnas celulares aisladas

La visión de estos cortes en microscopía óptica muestra que la placa de crecimiento conserva la arquitectura normal que vemos en los cortes histológicos teñidos con HE (Fig 5.1.1)

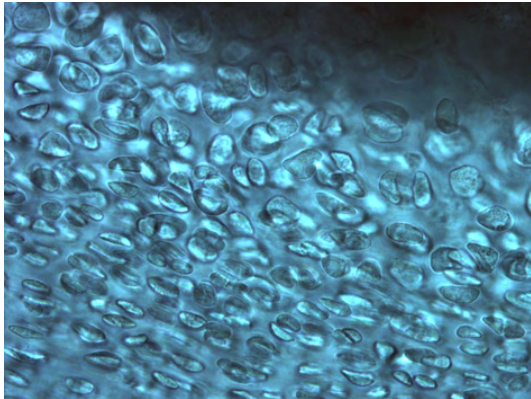


Fig 5.1.2. Placa de 11 días Germinativo 40x

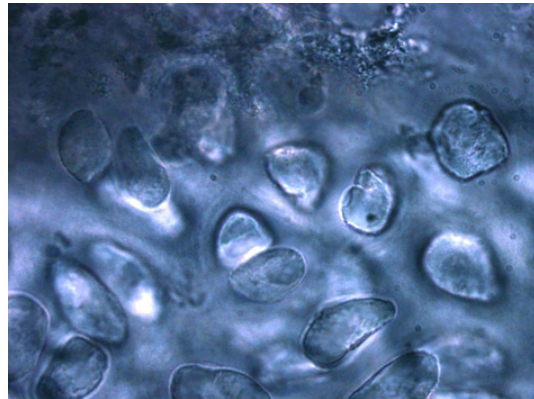


Fig 5.1.3. Placa de 11 días, germinativo 100x

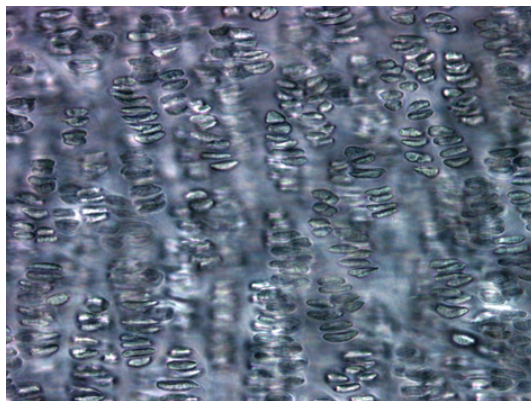


Fig 5.1.4. Placa de 11 días proliferativo 20x

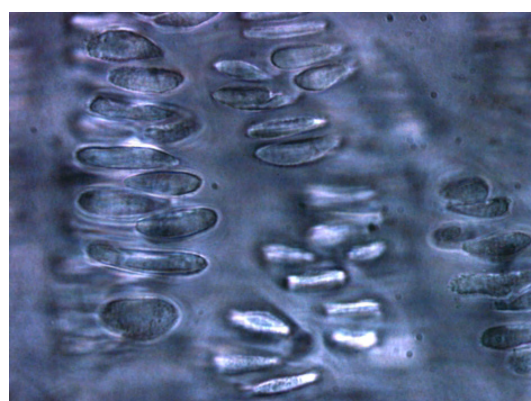


Fig 5.1.5. Placa de 11 días proliferativo 100x

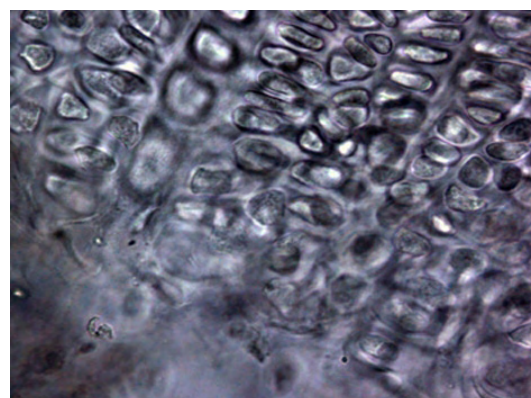


Fig 5.1.6. Placa de 11 días hipertrófico 40x

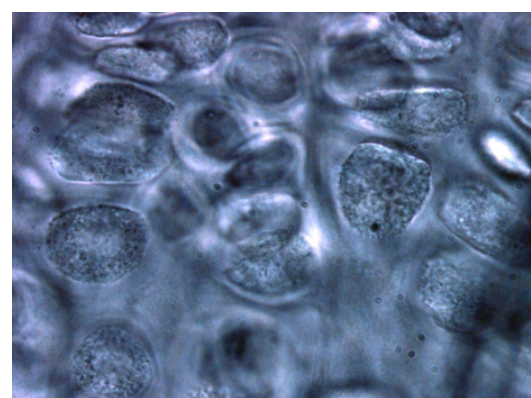


Fig 5.1.7. Placa de 11 días hipertrófico 100x

En primer lugar se identifica la estructura columnar de las células de la placa de crecimiento. Se identifican las tres regiones que convencionalmente se definen en la placa de crecimiento, zona germinativa (Fig 5.1.2 y 5.1.3), zona proliferativa (Fig 5.1.4 y 5.1.5) y zona hipertrófica (Fig 5.1.6 y 5.1.7).

Se delimitan de la misma forma el borde superior de la placa de crecimiento en su interfaz con la zona de la epífisis (Fig 5.1.8), y el borde inferior de la placa de crecimiento en la interfaz con la zona metafisaria (Fig 5.1.9).

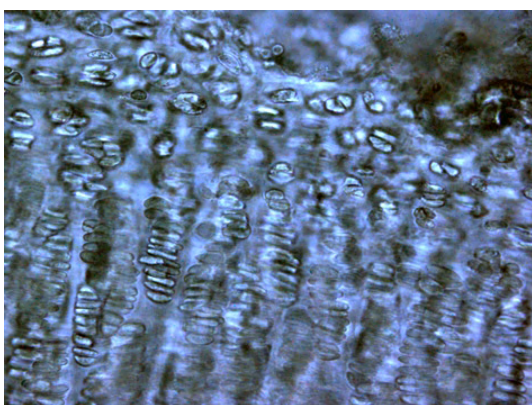


Fig 5.1.8. interfaz con epífisis 20x

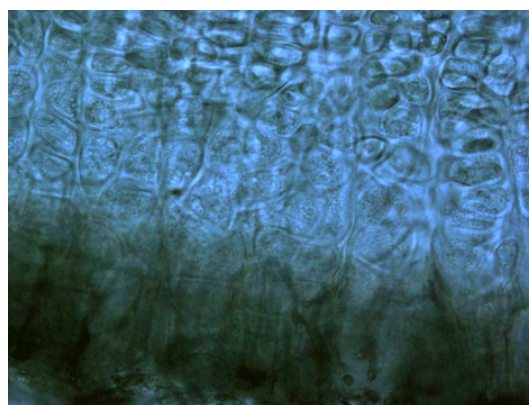


Fig 5.1.9. interfaz con metáfisis 40x

En la sección de la placa de crecimiento se observan distintas áreas con diferente luminosidad correspondientes al tejido cartilaginoso hialino, las zonas más oscuras, en las que no se aprecia luminosidad y son fotodensas corresponden al tejido óseo. (Fig 5.1.10 y 5.1.11)

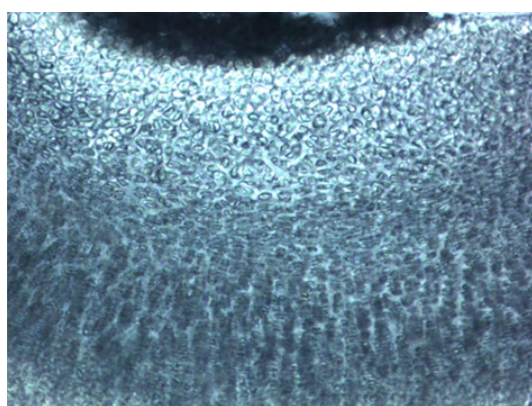


Fig 5.1.10. Placa de crecimiento 10x

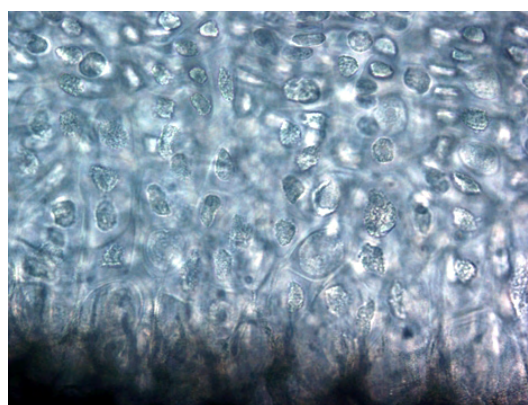


Fig 5.1.11. Hipertrófico 20x

En la placa de crecimiento se observan tres zonas de distinta luminosidad. La zona central, corresponde a una banda de color gris oscuro, posee una mayor densidad, es la menos luminiscente de las tres y corresponde a la zona del proliferativo donde se aprecia su

Resultados

arquitectura columnar característica. La zona inferior a esta, es la más luminiscente, posee una menor densidad celular, y se corresponde a la zona del hipertrófico, donde también se aprecia la estructura columnar que la caracteriza. La zona superior esta formada por una banda más irregular y estrecha, tiene un grado de luminiscencia intermedio entre las dos bandas anteriores y se corresponde a la zona del germinativo, en esta zona no se aprecia una arquitectura columnar, en su lugar se observa un cúmulo de elementos globulares. (Fig 5.1.1)

Zona del Germinativo

En la zona del germinativo (Fig 5.1.1 y 5.1.8) se observa que la zona que limita con la epífisis es irregular. Se observan estructuras globulares de bordes predominantemente lisos, y en alguna discretamente irregulares, esas estructuras son compatibles con las lagunas condrocitarias.

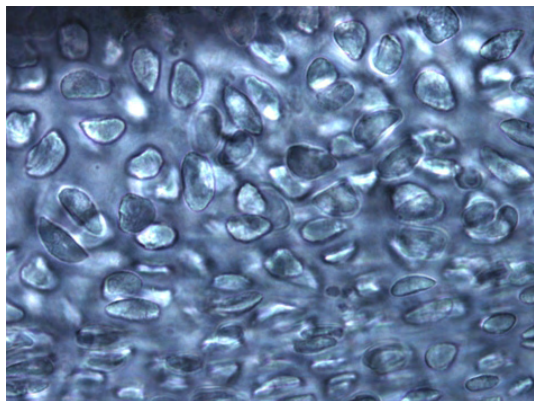


Fig 5.1.12. Germinativo 40x

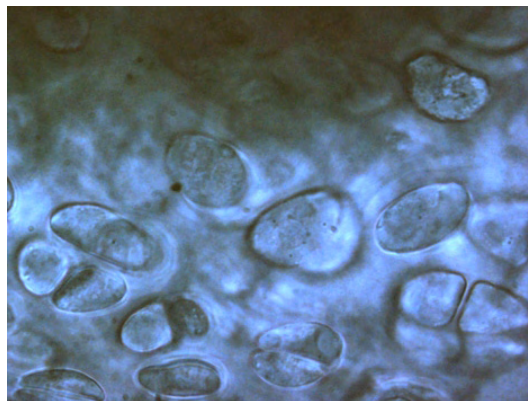


Fig 5.1.13. germinativo 100x

En ellas se observa una zona central, normalmente de mayor fotodensidad, en las que en su borde externo aparece una banda muy estrecha más oscura, y en la zona más externa aún se aprecia una banda luminiscente que la bordea (Fig 5.1.12 y 5.1.13) En algunas lagunas se observan dos estructuras globulares compatibles con dos células dentro de una misma laguna. En otras esta lectura se invierte. La estructura de la placa entre las lagunas condrales se observa mal definida con cambios muy variables en la fotodensidad lumínica. Llama la atención que la densidad celular es mayor que la que de forma convencional, en los estudios histológicos se atribuye a esta zona, haciendo salvedad como es evidente del grosor del corte. Si se observa que estas laguna son aparentemente de mayor tamaño que en la zona proliferativa.

Zona del Proliferativo

Esta zona se define claramente por una arquitectura columnar del conjunto de las

células que la componen en “pilas de monedas” (Fig 5.1.14 y 5.1.15).

El relieve de las células toma una configuración elíptica, a modo de almendra. La lectura de estas estructuras es similar a la realizada previamente. En los campos más próximos a la zona germinativa se aprecian figuras que se asemejan a las de citocinesis celular.

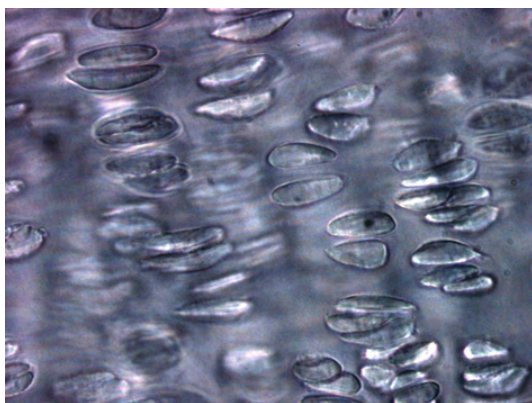


Fig 5.1.14.proliferativo 40x

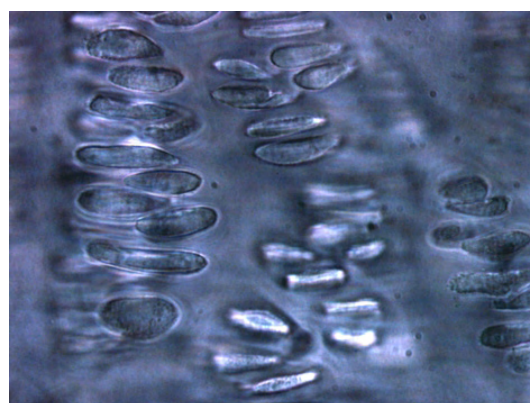


Fig 5.1.15. Proliferativo 100x

Zona del Hipertrófico

En esta zona el conjunto de estructuras adquieren la arquitectura columnar (Fig 5.1.6). Las lagunas adquiere un configuración más poliédrica, que se hace más notable conforme se aproxima a la metáfisis (Fig 5.1.16 y 5.1.17). En estas estructuras compatibles con las lagunas de condrocitos se observa un aumento de la imagen granular dentro de la laguna, y en algunos casos la presencia de una imagen globular.

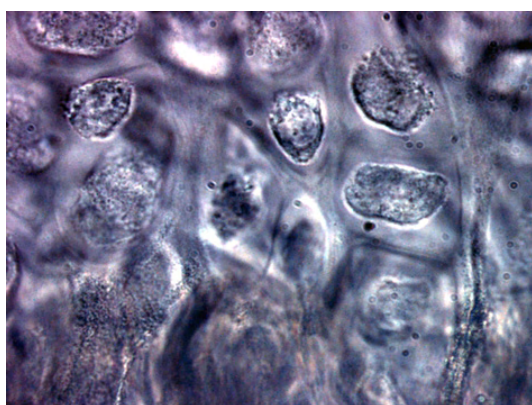


Fig 5.1.16. Hipertrófico 100x

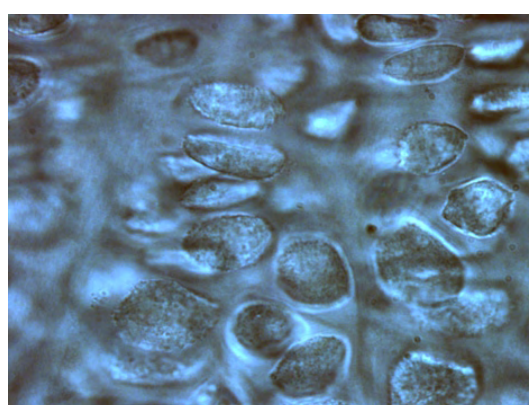


Fig 5.1.17. hipertrófico 100x

Estos mismos cortes se procesaron para estudio histológico con tinción de HE, para la correlación de imágenes. Esta técnica se encuentra en curso de estudio con métodos de tinción de histoquímica e inmunohistoquímica con secciones paralelas procesadas en parafina a las

Resultados

que se aplican los mismos métodos de tinción para contrastación y validación.

5.1.2 Valoración de la muerte celular

En este ensayos se han planteado dos preguntas:

1. ¿Qué porcentaje de células muertas hay en la placa de crecimiento, una vez extraída, y mantenida en un medio nutritivo durante un periodo de tiempo?.
2. ¿La lesión traumática en la metafisis- como ocurrirá en el trasplante de placa- repercute en el porcentaje de células muertas encontradas en la placa de crecimiento?

El estudio se han realizado en varias secciones de placa de crecimiento valoradas con la técnica de transiluminación. Se ha usado el colorante de Azul Tripán para valorar las células muertas. Este colorante cuando entra en la célula viva es reducido a su forma sin color, siendo re-oxidado por el sistema terminal oxidasa en la mitocondria, en una célula viva solamente la mitocondria aparecerá azul, mientras que la célula muerta se teñirá completamente.

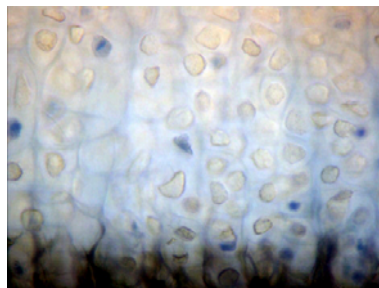


Fig 5.1.18. ATripan control20x

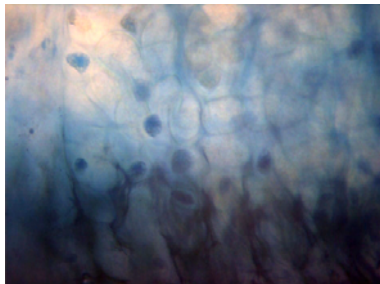


Fig 5.1.19. A 1 hora 20x

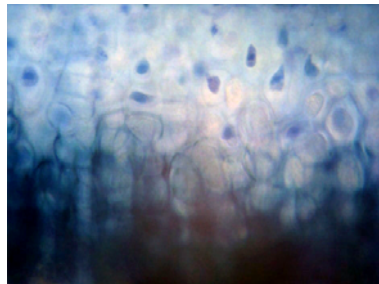


Fig 5.1.20. A 3 horas 20x

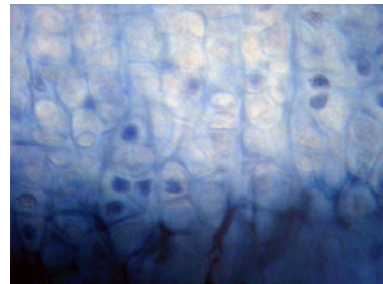


Fig 5.1.21. A 4 horas 20x

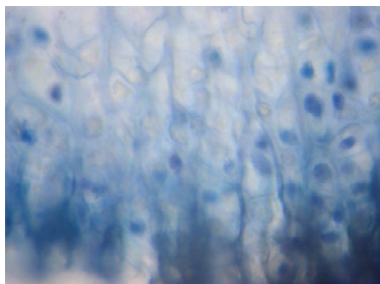


Fig 5.1.22. B 1 hora 20x

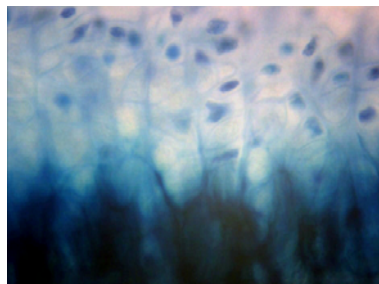


Fig 5.1.23. B 3 horas 20x

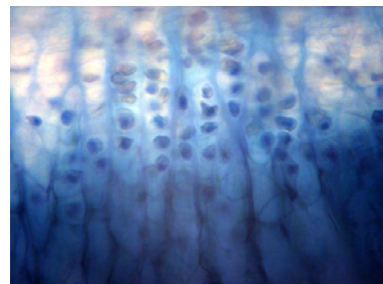


Fig 5.1.24. B 4 horas 20x

Se mide el índice de Azul Tripán: AT+ / total

Ensayo A: Para responder a la primera pregunta se han extraído 9 placas de crecimiento del radio izquierdo de ratas hembras de 19 días, se han colocado en medio nutriente, (DMEN básico) y se han teñido con el colorante, valorando el índice azul Tripán en unos periodos de tiempo determinados. Se han empleado 3 placas por tiempo de estudio.

Ensayo B: Para responder a la segunda pregunta en 9 ratas hembra de 19 días se ha realizado una osteotomía en metáfisis del radio izquierdo. En periodos sucesivos de tiempo similar al ensayo anterior, se han extraído las placas de crecimiento para su estudio, 3 ratas por tiempo de estudio.

Tabla 5.1.1: Valoración del porcentaje de células muertas en la placa d crecimiento. A ensayo en placa de cultivo. B, ensayo de lesión metáfisis. cls, células. AT, azul tripán.

	Tiempo de estudio					
	1h		3h		4h	
	% cls. AT-	% cls. AT+	% cls. AT-	% cls. AT+	% cls. AT-	% cls. AT+
Ensayo A	91.75	8.25	91.67	8.33	92.97	7.03
Ensayo B	82.20	17.31	61.62	38.40	45.71	51.23

- En el estadio inicial, recién extraída la placa de crecimiento, apenas se observa en la zona del hipertrófico células Azul-Tripán positivas (Fig 5.1.18).
- En el ensayo A (Tabla 5.1.1), no se observa incremento de células Azul-Tripán positivas desde el inicio al final del ensayo, (Fig 5.1.19 a 5.1.21)
- En el ensayo B (Tabla 5.1.1), se observa un incremento de células Azul-Tripán positivas desde el inicio al final del ensayo, (Fig 5.1.22 a 5.1.24)

La placa de crecimiento en el medio nutriente (ensayo A) mantiene aproximadamente el mismo porcentaje de células muertas en las primeras horas. La placa de crecimiento con un daño en la metáfisis (Ensayo B) muestra un incremento del porcentaje de células muertas en las primeras horas.

Los datos obtenidos son orientativos pero pueden ayudar en el planteamiento de los estudios posteriores para valorar los planteamientos de estimulación celular en los trasplantes de placa de crecimiento.

5.2 Resultados cultivo placa “in vitro”

Se extrajeron las placas de crecimiento de ambas tibias de 2 ratas y se cultivaron de acuerdo con el esquema indicado en el método. Los ensayos se denominaron 01, obtenidos de la rata 1 y 02 obtenidos de la rata 2. El segundo numero hace referencia a la sección cortada. Los casos se denominan en primer lugar por el numero de histología asignado y entre paréntesis la referencia a la trazabilidad del origen de la pieza.

- Rata 1, tibia izd: se realizaron 4 ensayos: 01-1; 01-2; 01-3; 01-9
- Rata 1, tibia dech: se realizaron 5 ensayos: 01-4; 01-5; 01-6; 01-7; 01-8
- Rata 2, tibia izd: se realizaron 5 ensayos: 02-1; 02-2; 02-3; 02-4; 02-5
- Rata 2, tibia dech: se realizaron 4 ensayos: 02-6; 02-7; 02-8; 02-9

5.2.1 Controles en fresco previos al cultivo

Previamente a la introducción de las piezas en cultivo, para verificar que ambas zonas de la placa de crecimiento, germinativo y proliferativo, habían sido separadas correctamente se examinaron microscópicamente, y se tomaron medidas de cada sección con ocular milimetrado. En las Fig 5.2.1 a 5.2.3 se muestran imágenes de las piezas antes del cultivo.

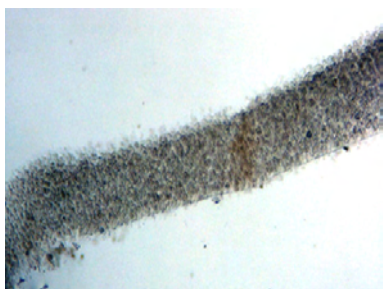


Fig 5.2.1. Sección de Germinativo
4x TI

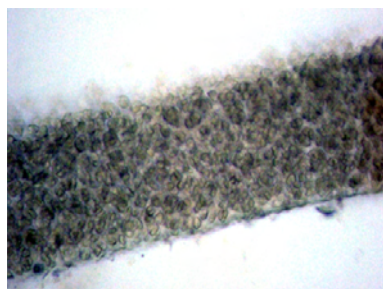


Fig 5.2.2. Sección de Germinativo
10x TI

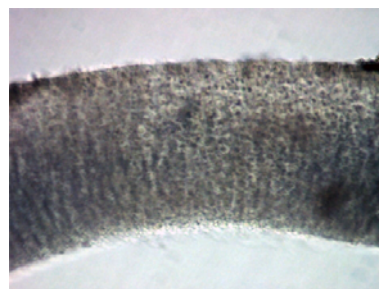


Fig 5.2.3. Sección de proliferativo
10x TI

Se realizaron entre 5-7 medidas para el alto de la pieza y entre 2-3 medidas de largo. Los números expresados en las tablas para cada caso corresponden a los promedios de estas medidas en micras.

5.2.2 Cultivo en medio DMEM-INS-TGF

Caso 03-060 (01-3) Cultivo de Germinativo.

Se obtiene una pieza de cultivo de forma rectangular de 1.606 x 660 μm en la medición realizada sobre la pieza procesada en histología, medidas mucho mas pequeñas que las obtenidas sobre la misma pieza tras el cultivo, debido a la retracción que sufren los tejidos en el procesamiento (Fig. 5.2.4). Se observa un eje de lectura desde el borde superior al inferior que corresponde a un patrón de células condrocíticas relativamente homogéneo, con células de estirpe condral aisladas que en ocasiones tienden a configurar clones celulares. En la parte superior de la imagen, correspondiente a la zona del germinativo, se observa un cierto pleomorfismo celular y la proporción núcleo /citoplasma en las células es mayor, esta proporción se invierte al avanzar hacia la zona distal del tejido, donde el citoplasma es mayor, apareciendo células binucleadas y clones celulares. (Fig 5.2.5 y 5.2.6)

La matriz extracelular presenta cierta heterogeneidad de tinción, con un marcado aclaramiento en la zona distal, este aclaramiento de la matriz también esta presente en las zonas marginales de la pieza. Las lagunas vacías aumentan hacia el polo distal de la preparación, aproximadamente el 25 % inferior de la preparación lo ocupa una banda hipocromática con abundantes lagunas vacías.

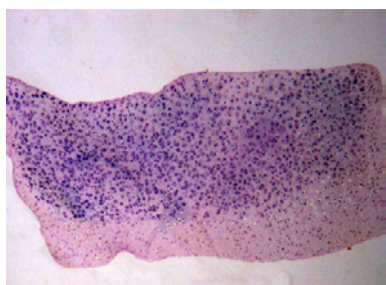


Fig 5.2.4. Caso 03-060 Pieza de cultivo Germinativo 4x tinc. HE

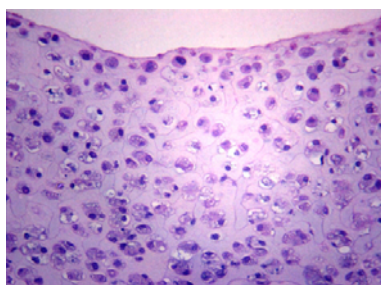


Fig 5.2.5. Caso 03-060. Borde superior Germinativo 20x tinc. HE

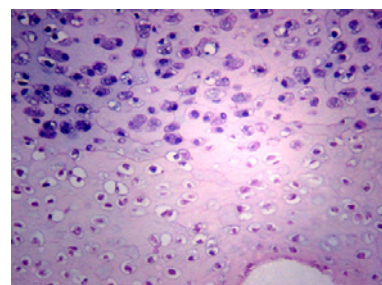


Fig 5.2.6. Caso 03-060. Borde inferior Germinativo 20x tinc. HE

Caso: 03-060. Germinativo. Medidas promedio de la pieza en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: antes del cultivo	998,33 μm	2.187,5 μm
Día 3: tras el cultivo	991,43 μm	2.062,5 μm

Caso 03-055 (01-6) Cultivo de Germinativo.

Se obtiene una pieza de cultivo de forma poligonal irregular de 1.225 x 932 μm , tras el procesamiento, en la que se identifica un borde superior e inferior (Fig 5.2.7). Se observa un patrón de células condrocíticas relativamente homogéneo y una matriz extracelular con zonas

Resultados

de diferente cromaticidad. (Fig 5.2.8). En el polo proximal se aprecian células de estirpe condral en clones y aisladas, con núcleo prominente y citoplasma muy vacuolado, algunos núcleos eosinofílicos. (Fig 5.2.8). Hacia el centro, la *ratio* núcleo/citoplasma es similar, con vacuolas citoplasmáticas y lagunas vacías. En uno de los márgenes laterales algunas células tienen un eje perpendicular, sin poder definirse una clara estructura pericondral. Hacia el polo distal cambia la arquitectura celular, se observan clones celulares y lagunas con 2 células que tienden a una arquitectura columnar. (Fig 5.2.9).

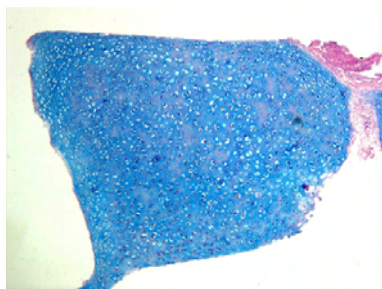


Fig 5.2.7. Caso 03-055
Germinativo pieza de cultivo 4x
tinción AA

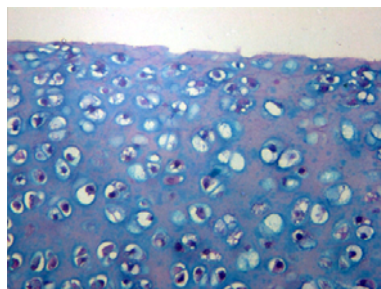


Fig 5.2.8. Caso 03-055
Germinativo zona proximal 20x
tinción AA

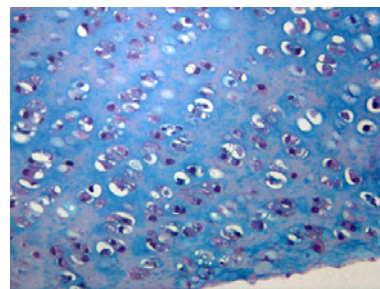


Fig 5.2.9. Caso 03-055
Germinativo zona distal 20x
tinción AA

Caso: 03-055. Germinativo. Medidas promedio de la pieza en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: antes del cultivo	1.040,00 μm	2.075,0 μm
Día 3: tras el cultivo	1.082,86 μm	2.000,0 μm

Caso 03-062 (01-2) Cultivo de Proliferativo.

Se obtiene una pieza de cultivo de forma rectangular (Fig 5.2.10). La pieza tiene un eje de lectura, en el borde proximal de la preparación se observa un patrón de células mononucleares con una proporción núcleo citoplasma a favor del núcleo. Los núcleos son redondos y la laguna condrocitaria apenas es perceptible. (Fig 5.2.11 y 5.2.12)

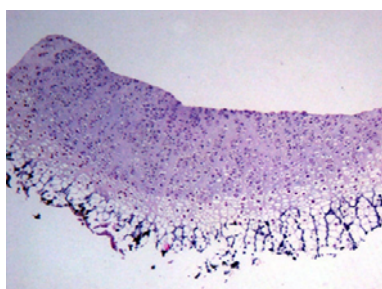


Fig 5.2.10. Caso 03-062
Proliferativo pieza de cultivo 4x,
tinción HE

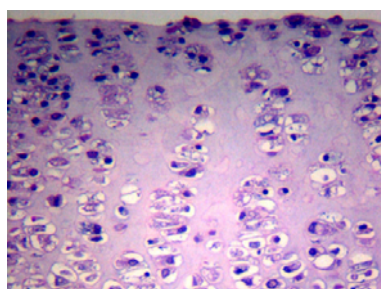


Fig 5.2.11. caso 03-062
Proliferativo zona proximal 20x,
tinción HE

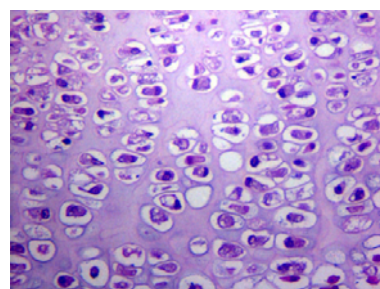


Fig 5.2.12. Caso 03-062
Proliferativo zona central 40x,
tinción HE

Caso: 03-062. Proliferativo. Medidas promedio de la pieza en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: antes del cultivo	1000 μm	2.625,0 μm
Día 3: tras el cultivo	1070 μm	2.662,5 μm

Caso 03-054 (01-5) Cultivo de Proliferativo

Se obtiene una pieza de cultivo rectangular e irregular (Fig 5.2.13), con un eje de lectura en donde se aprecian unas células de núcleo alargado con el eje mayor de este núcleo perpendicular al eje de desarrollo de la placa, con una arquitectura columnar típica de zona proliferativa. (Fig 5.1.14). En el extremo superior se observan células condrocitarias de núcleo redondo con marcada heterocromatina, y una ratio núcleo/citoplasma alta, las células están aisladas y ocasionalmente se aprecian algunos clones.

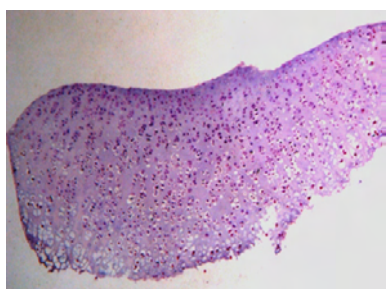


Fig 5.2.13. Caso 03-054
Proliferativo 4x, tinción HE

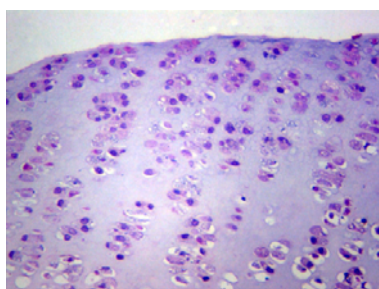


Fig 5.2.14. Caso 03-054
Proliferativo 20x, tinción HE

El borde inferior de la pieza esta formado por una zona hipertrófica. En un extremo del cultivo se aprecia una discreta necropsia de la zona con lagunas vacías y núcleos eosinófilos.

Caso: 03-054. proliferativo. Medidas promedio de la pieza en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: antes del cultivo	608 μm	1.937,5 μm
Día 3: tras el cultivo	798 μm	1.912,5 μm

Caso 03-065 (01-4) Co-cultivo de las zonas de Germinativo y Proliferativo

La pieza que corresponde al germinativo tiene una estructura alargada con unas medidas de 1.775 x 275 μm , tras el procesamiento (Fig 5.2.15). La muestra que correspondería a proliferativo, es una pieza de tejido cartilaginoso hialino, con medidas posterior al cultivo de 2.000 x 250 μm de tamaño, en la que se distingue un eje de lectura. La zona superior esta constituida por condrocitos aislados y conforme avanzamos en el eje de lectura, se observan columnas pequeñas de 3-4 células y clones de 3 y 4 células

Resultados

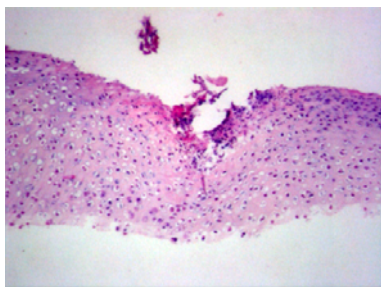


Fig 5.2.15. Caso 03-065
Germinativo 4x tinción HE

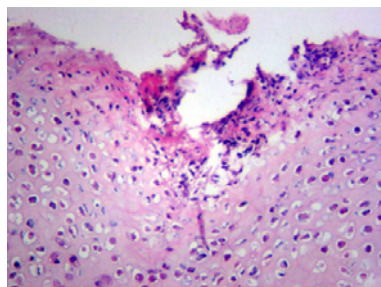


Fig 5.2.16. Caso 03-065
Germinativo 10x tinción HE

En el centro de la zona proximal del germinativo hay una hendidura, donde se observan células libres en el espacio invaginado. En los bordes interiores de esta hendidura se observan algunas lagunas condrales abiertas (Fig 5.2.16).

Hacia el borde inferior de la pieza, las lagunas se agrandan adquiriendo la arquitectura de hipertrófico.

Caso: 03-065. Germinativo y Proliferativo. Medidas de las piezas en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: Germinativo antes del cultivo	782,0 μm	2.137,5 μm
Día 3: Germinativo tras el cultivo	868,3 μm	2.162,5 μm
Día 0: Proliferativo antes del cultivo	804,0 μm	2.062,5 μm
Día 3: proliferativo tras el cultivo	983,3 μm	2.175,0 μm

5.2.3 Cultivo en medio DMEN-INS

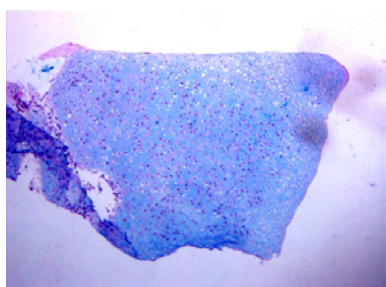
Caso 03-061 (01-8) Cultivo de Germinativo

Se obtiene una pieza de cultivo de forma poligonal irregular con unas dimensiones procesada de 1.010 x 876 μm . Se identifica un borde superior e inferior (Fig 5.2.17), con un patrón de células condrales homogéneas y una matriz con heterogeneidad cromática.

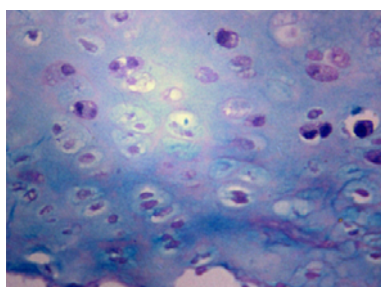
En el borde superior de la pieza se observan numerosas lagunas con componente celular junto a otras vacías. Hacia el centro de la preparación núcleos redondos, con citoplasma amplio y vacuolado. En el extremo distal, ocupando un 10 % de la pieza, aparecen clones celulares, células binucleadas y un discreto patrón de estructuras columnares. (Fig 5.2.18). En uno de los bordes el cultivo aparece liso, no hay continuidad en el componente condral, las lagunas son mas pequeñas, hay predominio de lagunas vacías, aparece algún núcleo compatible con célula pericondral. En el borde contrario se observan abundantes células con bordes discontinuos en el cartílago producidos por lagunas condrocitarias abiertas,

se observan células multinucleadas de hábito condroclástico.

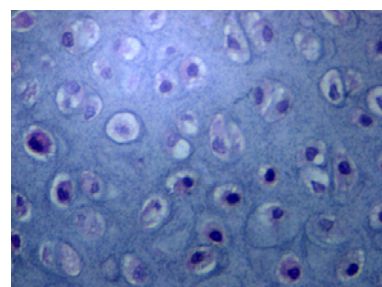
Caso: 03-061. Germinativo. Medidas promedio de la pieza en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: antes del cultivo	1.068,33 μm	2.625,0 μm
Día 3: tras el cultivo	1.092,86 μm	2.687,5 μm



*Fig 5.2.17. Caso 03-061
Germinativo 4x tinción HE*



*Fig 5.2.18. Caso 03-061
Germinativo dist 40x tinción HE*



*Fig 5.2.19. Caso 03-051
Germinativo 20x, tinción HE*

Caso 03-051 (02-9) Cultivo de Germinativo

Se obtiene un espécimen de cultivo de forma poligonal irregular de 2.500 x 820 μm , tras el procesamiento, en el que se identifica un borde superior e inferior. Se observa un patrón claro de germinativo, células redondas con núcleos redondos, grandes en relación al citoplasma. (Fig 5.2.19). La ratio núcleo/citoplasma es claramente a favor del núcleo y va variando a medida que nos distanciamos de la zona superior, haciéndose mas pequeña a medida que aumenta el tamaño del citoplasma y disminuye el del núcleo. Hacia la zona central se observan algunos clones de dos células.

Caso: 03-051. Germinativo. Medidas promedio de la pieza en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: antes del cultivo	1.178,57 μm	2.875,0 μm
Día 3: tras el cultivo	1.298,57 μm	2.875,0 μm

Caso 03-066 (01-7) Cultivo de Proliferativo

La muestra de cultivo es una pieza alargada, rectangular de 1.750 x 250 μm , tras el procesamiento, donde se identifica un eje orientativo. (Fig 5.2.20). Está constituida,

Resultados

prácticamente en su totalidad, por condrocitos de hábito hipertrófico con núcleo redondo. Estas células aparecen muy compactadas y con poca matriz extracelular.

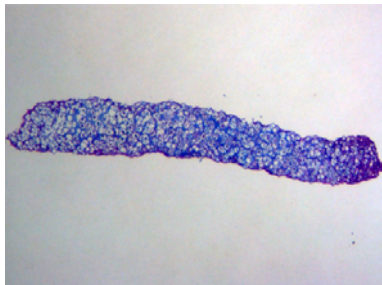


Fig 5.2.20. Caso 03-066
Proliferativo 4x, tinción AA

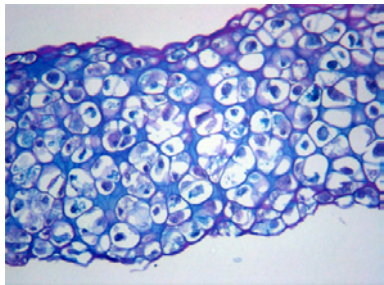


Fig 5.2.21. Caso 03-066
Proliferativo 20x, tinción AA

En el borde proximal de la pieza se observa una fila de 1 ó 2 células, con laguna elongada, pero sin llegar a constituir una estructura columnar. En el borde distal apreciamos células que recuerdan el primer hipertrófico. (Fig 5.2.21)

Caso: 03-066. proliferativo. Medidas promedio de la pieza en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: antes del cultivo	628,3 μm	2.325 μm
Día 3: tras el cultivo	698,3 μm	2.375 μm

Caso 03-058 (02-4) Cultivo de Proliferativo

La muestra de cultivo es una pieza irregular, cuadrangular, con unas dimensiones de 750 x 600 μm , en tinción, donde se puede identificar el eje de desarrollo. (Fig 5.2.22). En la zona proximal se identifican células aisladas, algunas de núcleo redondo, con una matriz discretamente basófila, con aspecto de "lavado". (Fig 5.2.23). La zona media esta constituida por células formando una arquitectura columnar, propia de tejido proliferativo, con el eje mayor de los núcleos perpendicular al eje de crecimiento de la placa. (Fig 5.2.24). En la zona distal se identifica tejido hipertrófico, con lagunas con células, vacías y algunas abiertas.

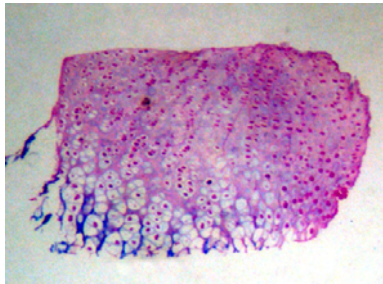


Fig 5.2.22. Caso 03-058
proliferativo 4x, tinción HE

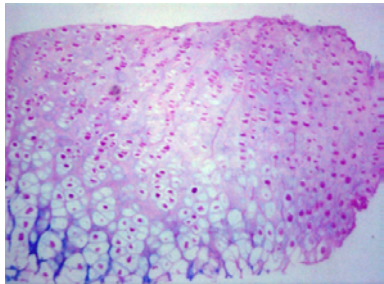


Fig 5.2.23. Caso 03-058
Proliferativo 10x, tinción HE

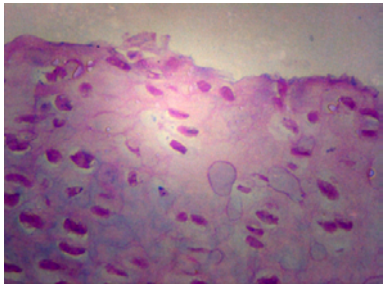


Fig 5.2.24. Caso 03-058 zona
proximal 40x, tinción HE

Caso: 03-058. proliferativo. Medidas promedio de la pieza en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: antes del cultivo	784,3µm	2.212,5 µm
Día 3: tras el cultivo	587,1 µm	2.162,5 µm

Caso 03-052 (02-8) Cultivo de Proliferativo

La muestra de cultivo es una pieza poligonal, alargada de 1.800 x 750 µm, donde se identifica zona proximal y distal (Fig 5.2.25). La zona proximal, ocupando aproximadamente el 50 % de la pieza, esta constituida por células de carácter hipertrófico con núcleos irregulares y lagunas vacías, y con una poca matriz extracelular. (Fig 5.2.26). En la zona distal, que ocupa el otro 50 % , se aprecian lagunas condrocitarias abiertas, con la pared revestida de una estructura muy eosinófila, y con células fusiformes e irregulares en su interior. En esta zona, también se aprecian células poligonales con el núcleo en un extremo.(Fig 5.2.27)

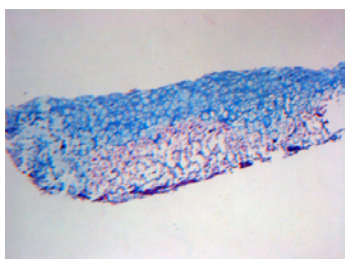


Fig 5.2.25.: Caso 03-052 Proliferativo 4x, tinción AA

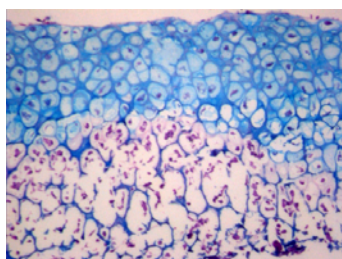


Fig 5.2.26.: Caso 03-052 Proliferativo 10x tinción AA

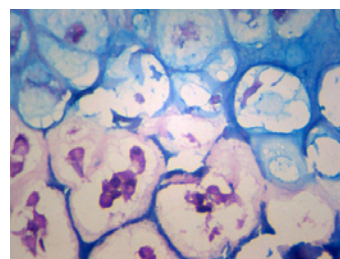


Fig 5.2.27.: Caso 03-052 zona central 40x, tinción AA

Caso: 03-052. Proliferativo. Medidas promedio de la pieza en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: antes del cultivo	922,5µm	2,250,0 µm
Día 3: tras el cultivo	1.283,3 µm	2.312,5 µm

Caso 03-059 (02-2) Co-cultivo de Germinativo y Proliferativo

La pieza que corresponde al tejido germinativo esta constituida por un tejido cartilaginoso, donde se observan condrocitos que forman clones, no columnas. La pieza es muy homogénea, en el tercio medio superior se observa una pequeña invaginación en cuyas paredes abocan algunas lagunas condrocíticas, mostrando en la entrada restos celulares (Fig 5.2.29). En todos los bordes del espécimen de cultivo, los condrocitos tienden a presentar un núcleo cuyo eje mayor tiende a ser tangencial al borde superior de la preparación (Fig 5.2.30)

Resultados

La pieza que corresponde al proliferativo tiene una estructura de tejido cartilaginoso, con una clara polaridad donde se observan columnas condrocíticas (Fig 5.2.31). En la zona proximal aparecen células aisladas y algunas formando clones. En la zona media de la pieza ya aparecen las columnas de diferente longitud. En la zona distal hay lagunas grandes con células de arquitectura hipertrófica. Este hipertrófico termina en una estructura columnar sin osificar (Fig 5.2.28)

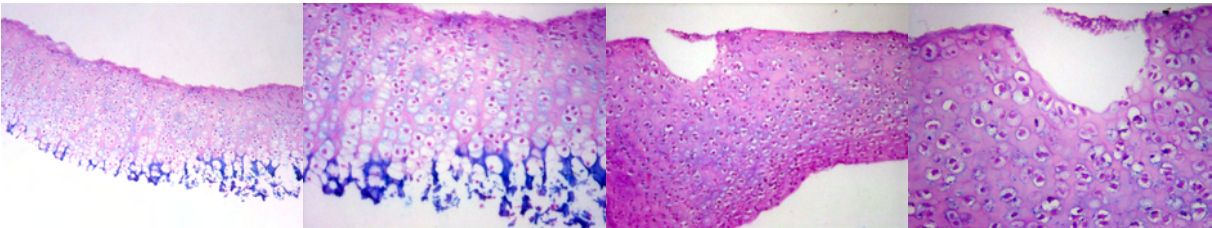


Fig 5.2.28.: Caso 03-059
Proliferativo 4x, tinción HE

Fig 5.2.29.: Caso 03-059
Proliferativo 10x tinción HE

Fig 5.2.30.:Caso 03-059
Germinativo 10x tinción HE

Fig 5.2.31.:Caso 03-059
Germinativo 20x tinción HE

Caso: 03-059. Germinativo y Proliferativo Medidas de las piezas en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: Germinativo antes del cultivo	765,7 μm	2.500,0 μm
Día 3: Germinativo tras el cultivo	942,86 μm	2.337,5 μm
Día 0: Proliferativo antes del cultivo	546,67 μm	2.325,0 μm
Día 3: proliferativo tras el cultivo	791,67 μm	2.375,0 μm

Caso 03-064 (02-7) Co-cultivo de Germinativo y Proliferativo

La muestra de cultivo en la parte correspondiente al germinativo tiene unas dimensiones de 2.350 x 900 μm en tinción y presenta un patrón de células condrocíticas aisladas sin formar arquitectura columnar. Las células tienden a formar clones y no se aprecia una polaridad muy definida (Fig 5.2.32).

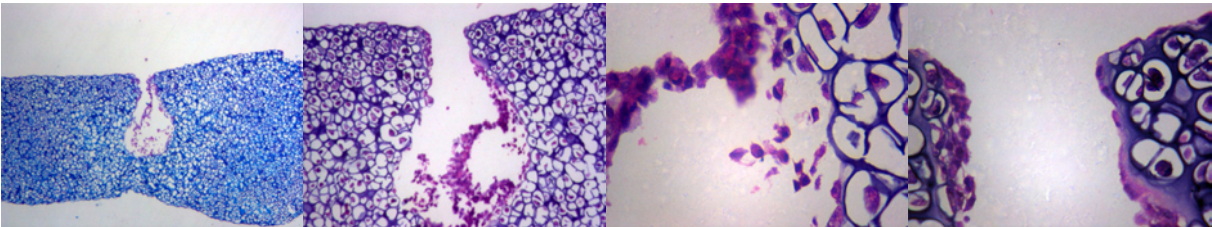


Fig 5.2.32.: Caso 03-064
Germinativo 10x, tinción AA

Fig 5.2.33.: Caso 03-064
Germinativo estructura invaginada 20x, tinción HE

Fig 5.2.34.: Caso 03-064
Germinativo estructura invaginada 40x tinción HE

Fig 5.2.35.: Caso 03-064
Germinativo cuello de la cavidad 40x tinción HE

En el centro del borde superior de la pieza, aparece una estructura invaginada en el cartílago, con forma de frasco de fondo redondo, rodeada de células condrales (Fig 5.2.33).

Algunas de estas células presentan la laguna abierta. En la cavidad de la invaginación se observan algunas células provenientes de estas lagunas abiertas, estas células también revisten la pared interior de lo que podríamos llamar cuello de la cavidad. (Fig 5.2.34 y 5.2.35).

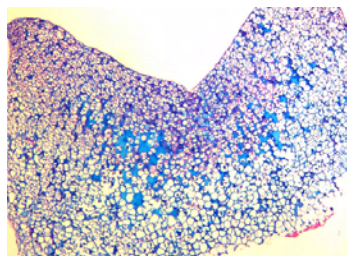


Fig 5.2.36.: Caso 03-064
Proliferativo 10x, tinción HE

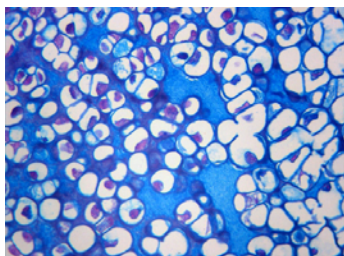


Fig 5.2.37.: Caso 03-064
Proliferativo 20x, tinción AA

La muestra de cultivo de tejido proliferativo es una pieza de tejido cartilaginoso hialino de 2.125 x 1.150 μm (Fig 5.2.36) La pieza presenta polaridad. En la zona superior se observan condrocitos columnados, con núcleo alargado, hacia el tercio medio se observan

células de hábito hipertrófico que en el borde distal pierden el núcleo y tienden a romperse las trabeculas de las lagunas, constituyendo lagunas mayores. (Fig 5.2.37)

Caso: 03-064. Germinativo y proliferativo. Medidas de las piezas en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Día 0: Germinativo antes del cultivo	758,5 μm	2.687,5 μm
Día 3: Germinativo tras el cultivo	931,4 μm	2.650,0 μm
Día 0: Proliferativo antes del cultivo	940 μm	2.250,0 μm
Día 3: proliferativo tras el cultivo	1.142,8 μm	2.337,5 μm

5.2.4 Histología de las piezas sin cultivo

Caso 03-068 (02-6) Germinativo

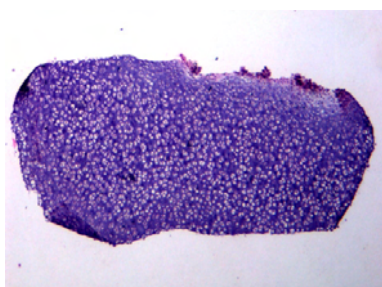


Fig 5.2.38. Caso 03-068 Germinativo
4x tinción AA

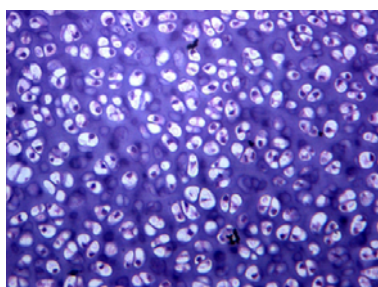


Fig 5.2.39. Caso 03-068 Germ
proximal 20x tinción AA

En la histología de germinativo sin cultivo, el corte muestra una visión transversal o coronal del tejido (Fig5.2.38).

La muestra es un casquete periférico de placa con restos de pericondrio, se observa un patrón homogéneo de células, con núcleos no heterogéneos en clones (Fig 5.2.39)

Resultados

Caso 03-053 (01-1) Proliferativo

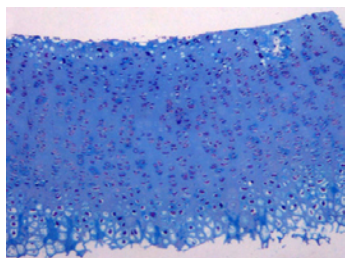


Fig 5.2.41. Caso 03-053 proliferativo 20x tinción AA

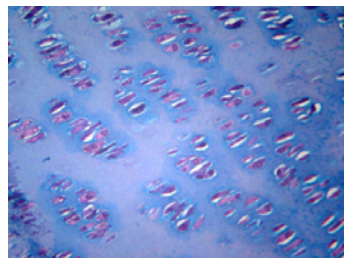


Fig 5.2.40.: Caso 03-053 proliferativo 20x tinción AB

En el proliferativo sin cultivo, se observa un patrón homogéneo de células en columnas con una zona distal de tejido hipertrófico. (Fig 5.2.41 y 5.2.40)

Caso: 03-068. Medidas promedio de la pieza en micras		
Condiciones	Altura	Largo
Germinativo sin cultivo	533,3 μm	2.000,0 μm
Proliferativo + hipertrófico sin cultivo	924,0 μm	2.125,0 μm
Proliferativo sin cultivo	758,0 μm	2.125,0 μm

5.2.5 Análisis de los resultados del cultivo “in vitro

Resultados del análisis estadístico mediante la prueba t de Student de las mediciones de alto y largo, realizadas sobre las piezas por transiluminación antes y después del cultivo expresadas en micras

Tabla 5.2.1: Medidas comparativas en μm de las piezas de cultivo de proliferativo (P) cuando este se cultiva solo.

Medio	Caso	Pieza	Alto		Largo	
			Dia 0	Dia 3	Dia 0	Dia 3
DMEN-INS-TGF	03-062	P	1.000,0	1.070,0	2.625,0	2.662,5
DMEN-INS-TGF	03-054	P	608,0	798,0	1.937,5	1.912,5
DMEN-INS	03-066	P	628,3	698,3	2.325,0	2.375,0
DMEN-INS	03-058	P	784,3	587,1	2.212,5	2.162,5
DMEN-INS	03-052	P	922,5	1.283,3	2.250,0	2.312,5
			t tab =	2,78	t tab =	2,78
			t cal =	1,08	t cal =	0,68

Análisis estadístico mediante la prueba t de Student.

El análisis estadístico de las dimensiones de las piezas de proliferativo (Tabla 5.2.1), nos muestra que no existen diferencias significativas en el crecimiento cuando este se cultiva solo con uno u otro medio de cultivo.

Tabla 5.2.2: Medidas comparativas en μm de las piezas de cultivo de Germinativo (G) cuando este se cultiva solo.

Medio	Caso	Pieza	Alto		Largo	
			Dia 0	Dia 3	Dia 0	Dia 3
DMEN-INS-TGF	03-060	G	998,3	991,4	2.187,5	2.062,5
DMEN-INS-TGF	03-055	G	1.040,0	1.082,8	2.075,0	2.000,0
DMEN-INS	03-061	G	1.068,3	1.092,8	2.625,0	2.687,5
DMEN-INS	03-051	G	1.178,5	1.298,5	2.875,0	2.875,0
			t tab =	3,18	t tab =	3,18
			t cal =	1,67	t cal =	0,83

Análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student.

El análisis estadístico de las dimensiones de las pieza de germinativo (Tabla 5.2.2), muestra que no existen diferencias significativas en el crecimiento cuando este se cultiva solo con uno u otro medio de cultivo

Tabla 5.2.3: Medidas comparativas en μm de las piezas de germinativo (G) cuando se co-cultiva junto a proliferativo en un pocillo.

	Caso	Tejido P+G	Alto		Largo	
			Dia 0	Dia 3	Dia 0	Dia 3
DMEN-INS-TGF	03-065	G	782,0	868,3	2.137,5	2.162,5
DMEN-INS	03-059	G	765,7	942,8	2.500,0	2.337,5
DMEN-INS	03-064	G	758,5	931,4	2.687,5	2.650,0
			t tab =	4,3	t tab =	4,3
			t cal =	4,91	t cal =	1,06

Análisis estadístico mediante prueba *t* de Student.

El análisis estadístico de las dimensiones de las piezas de germinativo (Tabla 5.2.3), muestra que existen diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la altura de la sección de germinativo cuando este se cultiva en el mismo pocillo con una sección de proliferativo.

Tabla 5.2.4: Medidas comparativas en μm de las piezas de proliferativo (P) cuando se co-cultiva junto a germinativo en un pocillo.

	Caso	Tejido P+G	Alto		Largo	
			Dia 0	Dia 3	Dia 0	Dia 3
DMEN-INS-TGF	03-065	P	804,0	983,3	2.062,5	2.175,0
DMEN-INS	03-059	P	546,6	791,6	2.325,0	2.375,0
DMEN-INS	03-064	P	940,0	1.142,8	2.250,0	2.337,5
			t tab =	4,3	t tab =	4,3
			t cal =	10,88	t cal =	4,59

Análisis estadístico mediante prueba *t* de Student.

El análisis estadístico de las dimensiones de la pieza (Tabla 5.2.4), muestra que existen diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en el crecimiento en altura y longitud de la sección de proliferativo cuando este se cultiva en el mismo pocillo con una sección de germinativo.

Resultados

Analizando las medidas obtenidas para cada grupo, vemos que los valores medidos en cada pieza, tanto el alto como el ancho, en todos los casos han aumentado de tamaño.

El análisis estadístico mediante la prueba t de Student nos indica que no hay diferencias significativas entre las dimensiones de las piezas antes y después del cultivo, cuando estas se cultivan de forma aislada, proliferativo solo en un pocillo y germinativo solo en otro. Pero si existen diferencias significativas en el crecimiento de las piezas cuando estas han sido co-cultivadas juntas, seccionadas físicamente, pero introducidas ambas en el mismo pocillo. Hay diferencias significativas en la altura del germinativo (Tabla 5.2.3), en el caso del proliferativo existen diferencias significativas tanto en altura, en este caso muy acusadas, como en anchura (Tabla 5.2.4)

Llama la atención que en los co-cultivos de germinativo y proliferativo aparezca de forma persistente en la pieza del germinativo una imagen de excavación condral invaginada en la zona central de la preparación, imagen en “botella”, con liberación de condrocitos en la misma. (Fig 5.2.15, 5.2.29 y 5.2.32)

5.3 Resultados injerto en cápsula renal

Se adquirieron imágenes de la placa en el momento de su extracción por transiluminación directa (TI) mediante microcopia óptica y posteriormente las piezas fueron incluidas en parafina para su estudio histológico mediante tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y Azul-Alcian (AA)

Los injertos se mantuvieron en la cápsula renal del receptor durante un periodo de 15 días, al concluir el tiempo se extrajo el riñón del huésped y se retiró el injerto de la cápsula renal.

Injerto de placa entera + anillo

En este caso se ha injertado la placa entera con su anillo pericondral en la cápsula renal del receptor.

La muestra extraída es una pieza alargada de tejido conjuntivo hialino de 4.250 μm x 1.125 μm . Las imágenes tomadas por TI en el momento de su extracción se corresponden con las de una placa de cultivo con criterios de normalidad a lo largo de su eje de desarrollo (Fig 5.3.1), con un buen desarrollo de germinativo y proliferativo con la imagen en columnas

celulares que lo definen. (Fig. 5.3.2 y 5.3.3).

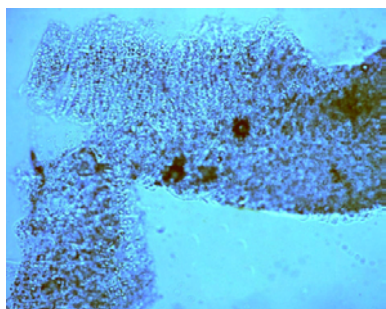


Fig 5.3.1. Placa de crecimiento completa 4x, TI

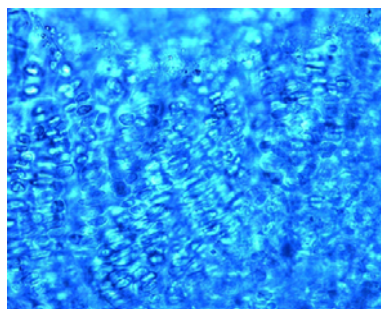


Fig 5.3.2.: Paso de Germinat. a Prolif. 10x TI

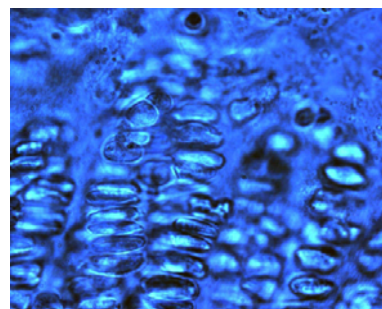


Fig 5.3.3.: Proliferativo 40x TI

En el estudio histológico se observa ,en el borde superior de la pieza, una banda de tejido fibro-conjuntivo de unas 100 μm de espesor, que no esta completamente unido a la placa, constituido por tejido fibroso, donde también se identifican algunas células plasmáticas y algún vaso. (Fig 5.3.4), esta banda de tejido conjuntivo se extiende también por los bordes. Este tejido no tiene una arquitectura específica, se ven células condrales aisladas y clones. Sin embargo, en los bordes se observa una estructura pericondral, con formación de un ribete celular que recuerda el anillo pericondral. Es importante resaltar que el resto de la preparación conserva una arquitectura semejante a la de una placa de crecimiento normal donde se distinguen las tres zonas que la integran.

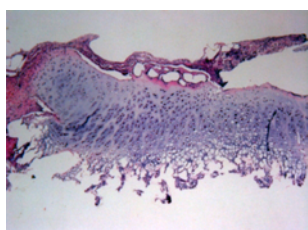


Fig 5.3.4.: Placa completa 4x tinción HE

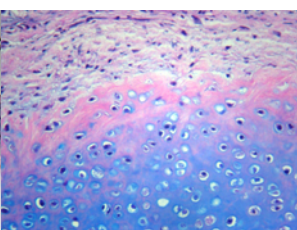


Fig 5.3.5.: Germinativ proximal 10x tinción AA

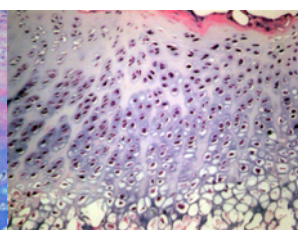


Fig 5.3.6.: Proliferativ 10x, tinción HE

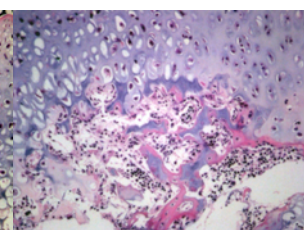


Fig 5.3.7.: Hipertrófico cel. granuloc 10x tinción HE

El borde superior de la pieza tiene una zona de matriz eosinófila de 150 μm de espesor en la que predominan unas células pequeñas con núcleo grande en proporción al citoplasma. En la zona basófila de este borde aparecen células aisladas y también algunos clones. (Fig 5.3.5). En la zona media se observan células de hábito proliferativo formando columnas, con algunas lagunas vacías hacia el borde mas distal (Fig 5.3.6). En el borde inferior se observan células hipertróficas sin formación de trabéculas óseas y células de habito histiocitario y linfocitario (Fig 5.3.7)

Resultados

Injerto de placa entera sin anillo

En este caso se ha injertado la placa entera en la cápsula renal del receptor sin el anillo pericondral.

La imagen por transiluminación se corresponde a la de una placa de cultivo con una forma irregular, mas compacta y de menor tamaño (Fig 5.3.8), pero donde se distinguen las diversas estructuras que la componen. Se observa la zona germinativa con menor celularidad, y anomalías en el fenotipo celular de la zona proliferativa (Fig 5.3.9 y 5.3.10), aunque se observa un tejido con una arquitectura columnar. En la zona del hipertrófico se aprecia una distorsión del fenotipo celular, condrocitos más pequeños e irregulares.

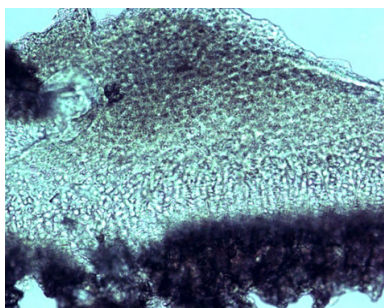


Fig 5.3.8.: Placa completa 4x, TI

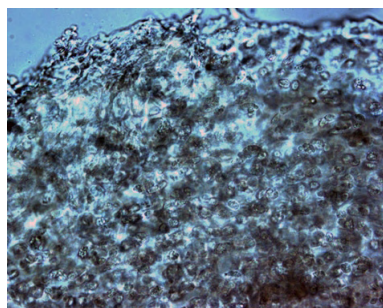


Fig 5.3.9.: Germinativo con células del huésped 10x TI

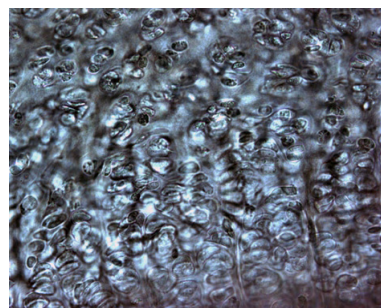


Fig 5.3.10.: Proliferativo 10x TI

El estudio histológico muestra una pieza de tejido conjuntivo hialino, de forma poliédrica e irregular donde se identifican un plano superior y un plano inferior. (Fig 5.3.11). En la zona superior se aprecian células mononucleadas, de núcleo redondo, y algunos clones (Fig 5.3.12). En la zona media se observa la formación de columnas de configuración normal con el eje mayor del núcleo perpendicular al eje de la placa. Llama la atención la observación de algunas columnas que presentan un cambio de dirección y se sitúan de forma transversal a la placa (Fig 5.3.13). En un extremo del borde inferior de la preparación se identifica una zona de cartílago hipertrófico, prolongado en columnas endocondrales donde participa de forma directa o indirecta en un proceso de osificación. En el otro extremo inferior hay un proceso de formación ósea, extraño a la placa, con un acúmulo de células mononucleadas de aspecto linfoide, histiocitos, células granulocíticas y plasmacitos (Fig 5.71).

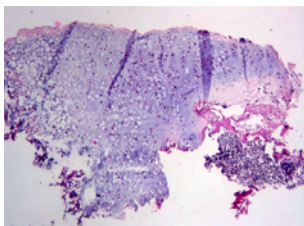


Fig 5.3.11.: Pieza de cultivo 4x tinc HE

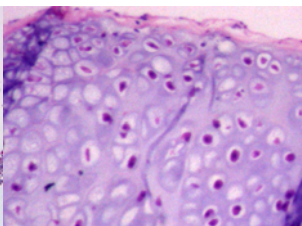


Fig 5.3.12.: Germinativo superior 20x, tinción HE

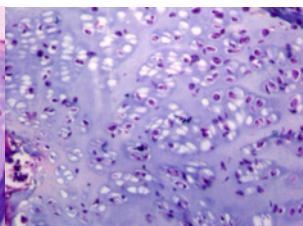


Fig 5.3.13.: Proliferativo 10x tinción HE

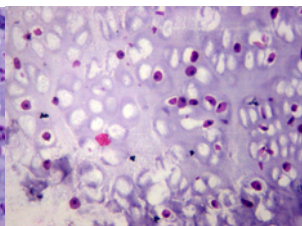


Fig 5.3.14.: Borde inferior 20x, tinción HE

Injerto de germinativo sin anillo

Se observa un tejido cubierto con una capa de células de hábito fibroblástico. se aprecian unas células de forma globular (Fig 5.3.15), seguidas de unas células poco aplanadas, compatibles con la zona del proliferativo (Fig.5.3.16). Estas células son capaces de formar columnas celulares (Fig. 5.3.17).

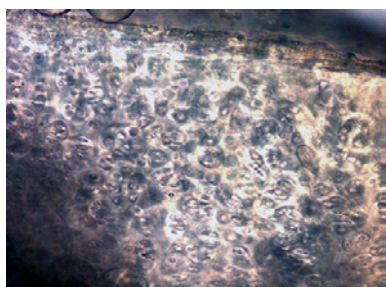


Fig 5.3.15. Germinativo borde superior 4x TI

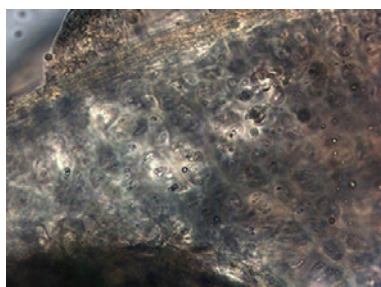


Fig 5.3.16. germinativo zona compatible con proliferat. 10x TI

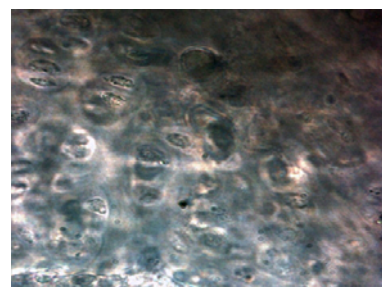


Fig 5.3.17. germinativo ordenamiento columnar 40x TI

Injerto de germinativo con anillo

La pieza extraída tiene una forma compacta, por TI se observa en el tercio superior células globulares, redondas características de zona germinativa (Fig 5.3.18) y a continuación una forma en arquitectura columnar más ordenada (Fig.5.3.19). Se observan columnas compatibles con la zona del proliferativo, con células aplanadas pero discretamente irregulares (Fig.5.3.19). En el tercio inferior se observan células de zona hipertrófica (Fig 5.3.20).

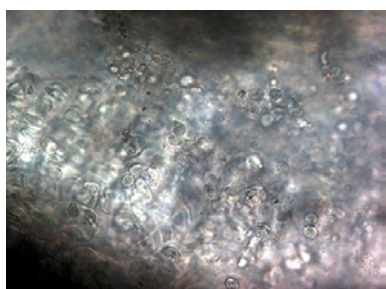


Fig 5.3.18. Pieza de germinativo 4x TI



Fig 5.3.19. Arquitectura columnar 10x TI

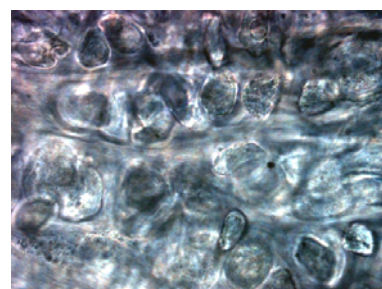


Fig 5.3.20. Columnas con cel. hipertróficas 40x TI

Injerto de proliferativo sin anillo

No se ha obtenido un cultivo satisfactorio. Se observa una masa irregular de tejido, en el que aparece una arquitectura celular en columnas (Fig.5.3.21), con columnas en la zona hipertrófica (Fig.5.3.22). En estas preparaciones ha llamado la atención las imágenes de vasos, próximos al injerto, en el tejido fibroso reactivo que lo rodea, no observadas en anteriores cultivos (Fig 5.3.23)

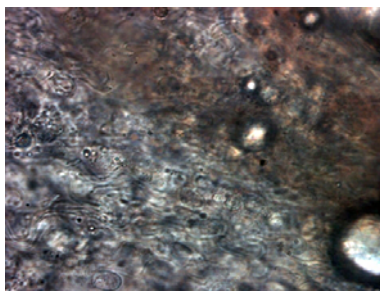


Fig 5.3.21. Pieza de proliferat. con columnas 10x TI

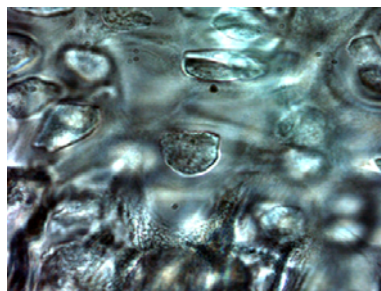


Fig 5.3.22. Zona hipertrófica 40x TI

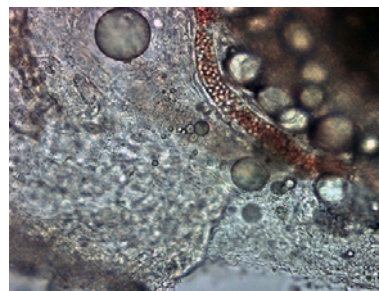


Fig 5.3.23. Vaso en tejido fibroso 10x TI

5.3.1 Valoración del injerto en capsula renal

Analizando los resultados obtenidos tras el el injerto en cápsula en los modelos ensayados con anillo pericondral y sin anillo, observamos que la placa presenta una estructura más definida cuando el injerto se realizó con su anillo, en la que además se conserva la arquitectura de la placa en sus distintas zonas.

Llama la atención la respuesta mayor del injerto de la zona del germinativo cultivada con el anillo pericondral.

5.4 Resultados resección de zonas e interposición de membrana

En los ensayos se han usado 6 ratas hembras de 19 días por grupo, en todos los casos el tiempo de seguimiento de los ensayos fue de 10 días excepto en los ensayos de interposición de membrana en los que el tiempo se prolongó hasta los 15 días.

● Pinchazo en placa en región entre zona germinativa y proliferativa

- **Primer ensayo:** Lesión traumática de la zona alta del proliferativo. El traumatismo se realiza mediante pinchazo con una aguja de insulina. Se observa discontinuidad en zona alta del proliferativo. En los bordes de la lesión se observan algunas células con núcleos eosinófilos. Aumento de clones celulares en germinativo. En matriz extracelular se aprecian áreas de fibrilación. (Fig. 5.4.1)
- **Segundo ensayo.** Inyección en la zona alta del proliferativo de 10 µl de medio DMEN. Se observa una lesión traumática similar a la anterior.
- **Tercer ensayo.** Inyección de 10 µl de sobrenadante de medio de cultivo de condrocitos en la zona alta del proliferativo. En los límites de la lesión se aprecian secuelas traumáticas en la matriz extracelular. Llama la atención que el proliferativo por debajo de la lesión tiene un comportamiento normal, sin embargo por encima se observa mayor número de células en la zona proliferativa; se

encuentran células de aspecto más “globoso”, se observa un aumento de la relación núcleo/citoplasma y un aumento de clones celulares en el germinativo. (Fig 5.4.2)

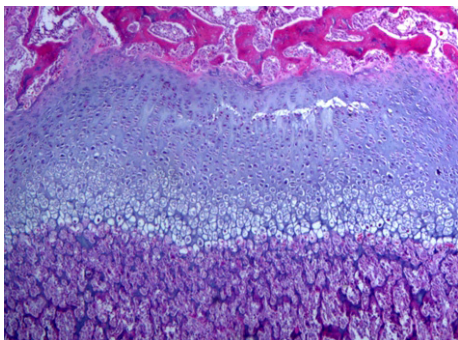


Fig 5.4.1. Discontinuidad en zona alta de proliferativo 4x HE

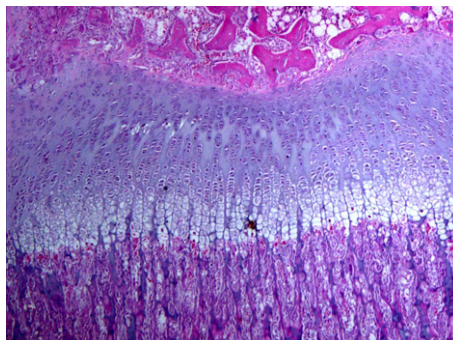


Fig 5.4.2. Perdida parcial de continuidad en prolif alto 4x HE

- **Extracción de la zona del germinativo.**

- **Primer ensayo.** Extracción de la zona germinativa. Se observan secuelas de lesión traumática en el borde superior de la placa. No se observa zona germinativa. Se observa pérdida de la arquitectura tisular de la placa de crecimiento, con distorsión de las columnas celulares y menor celularidad. Esta lesión es de predominio en zona central, las zonas laterales de la placa de crecimiento conservan mejor la arquitectura tisular. Llama la atención que en la región lateral hay un aumento de la celularidad de la zona germinativa al parecer por células de la zona marginal de la placa que se encuentra muy hipertrofiada (Fig. 5.4.3).
- **Segundo ensayo.** Extracción de la zona del germinativo y colocación de una esponja de colágeno. La respuesta es similar a la anterior.
- **Tercer ensayo:** Extracción de la zona germinativa y colocación de una esponja de colágeno e impregnación con 10 μ mL de sobrenadante de medio de cultivo de condrocitos procedentes del germinativo. Se observa anomalía en la arquitectura columnar de la placa de crecimiento, de forma predominante en región central y aumento de la altura de la zona germinativa. Se aprecia un aumento de la celularidad en la zona germinativa con abundantes clones celulares. (Fig. 5.4.5 y 5.4.6).
- **Cuarto ensayo:** Resección de la zona germinativa y sustitución de esta por una membrana de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,22 μ m. Se observa, junto a las lesiones secundarias del tipo de lesión que se produce en estos ensayos, anomalías en la arquitectura columnar de la placa de crecimiento aunque no pérdida de la arquitectura y un patrón celular de células redondas en la zona superior del proliferativo (Fig 5.4.4)

Resultados

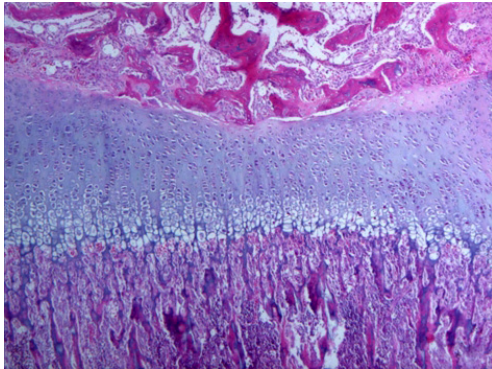


Fig 5.4.3. Discon en zona sup en interfaz con epifisis, alteración columnas cent. 4x HE

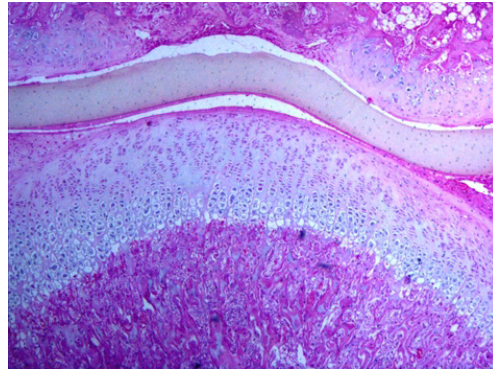


Fig 5.4.4. membrana de 0,22 μm sobre región superior de la placa 4x HE

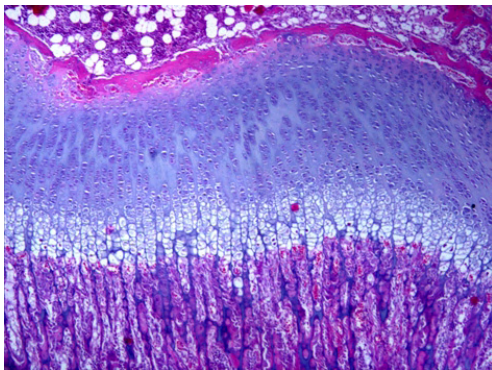


Fig 5.4.5. Control, región central de la placa de crecimiento 4x HE

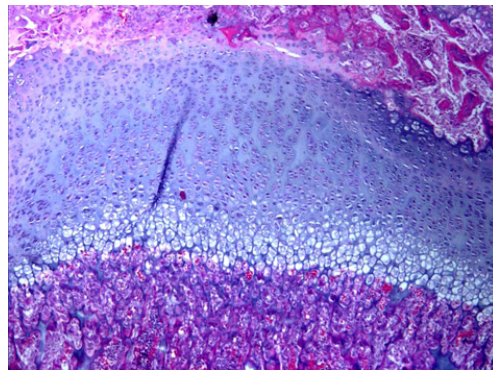


Fig 5.4.6. Ensayo reg. central, banda tej. fibroso y discont. en región superior 4x HE

5.4.1 Valoración resección de zona e interposición de membrana

Se hace referencia de forma única a las zonas de la placa de crecimiento. La resección de la zona germinativa conlleva una pérdida de la arquitectura columnar de la placa, disminución del proliferativo en la región central y aumento de la respuesta del proliferativo en región lateral. En la zona del germinativo resecado aparecen unas células redondas de hábito condral, esta respuesta aumenta con la administración del medio de cultivo de condrocitos. Se observa una respuesta de tipo hipertrófico en las zonas marginales superiores de la placa de crecimiento.

5 Resultados

5.5 Resultados estudio radiológico

La valoración radiológica se ha realizado de forma cualitativa y cuantitativa.

Cualitativamente se han valorado las luxaciones, desviaciones y malposiciones de la articulación implicada, con atención especial a las anomalías mostradas por la fisis.

Cuantitativamente mediante el estudio y análisis estadístico de medidas de la articulación implicada: cúbito, radio, fisis, epífisis, metáfisis.

Acrónimos de las medidas tomadas. De longitud expresadas en mm y angulares en grados.

- Longitud del cúbito (LC)
- Longitud del radio (LR)
- Longitud del eje proximal del radio (LPR)
- Longitud del eje distal del radio (LDR)
- Longitud de la fisis radial externa (LPE)
- Longitud de la fisis radial media (LPM)
- Longitud de la fisis radial interna (LPI)
- Longitud de la epífisis radial externa (LEE)
- Longitud de la epífisis radial interna (LEI)
- Anchura de la diáfisis radial (ADR)
- Anchura de la metáfisis radial (AMR)
- Anchura de la fisis proximal (APP)
- Anchura de la fisis distal (ADP)
- Anchura de la epífisis media (AEM)
- Angulo metafisario (GDR)
- Angulo diáfisis / eje fisis longitudinal (GDL)
- Angulo diáfisis / eje fisis transversal (GDT)
- Angulo diáfisis / epífisis (GDE)

Resultados

Los resultados se agrupan por método quirúrgico, series y grupos. Cada serie se dividió en grupos donde se estudiaron los cambios y evolución de la placa trasplantada a las 6, 12 y 24 semanas post-trasplante.

- Método quirúrgico E. trasplante de fisis sola
- Método quirúrgico J . trasplante de fisis con resto de metáfisis
 - Serie EC. Sin tratamiento celular
 - Serie E0. Células MSC en el momento del trasplante
 - Serie E15. Células MSC a los 15 días del trasplante
 - Serie JC. Sin tratamiento celular
 - Serie J15. Células MSC a los 15 días del trasplante

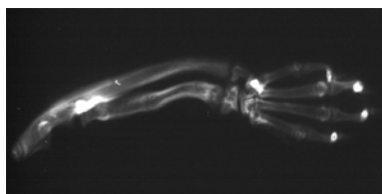
5.5.1 Serie EC sin terapia celular

Animales a los que se les ha realizado trasplante de la placa radial distal sola y no han recibido tratamiento con células MSC

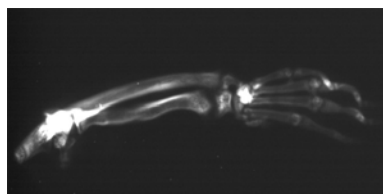
Grupo EC. Tiempo 6 semanas

Los casos agrupados tienen una lectura similar. La fisis del radio esta posicionalmente retrasada, en posición “minus” con respecto a la fisis del cúbito. El cúbito ha crecido mas que el radio y eso ha hecho que la mano se desvíe hacia el radio dando lugar a lo que se denomina una mano zamba radial.

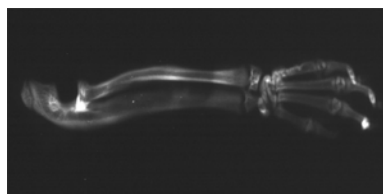
Esa desviación radial puede ser ligera, (Fig 5.5.1) o muy ligera (Fig 5.5.2). Hay un crecimiento irregular en la zona metafisaria, que hace una impronta en el cúbito y lo desplaza produciendo una ligera curvatura, que contribuye a aumentar la desviación radial.



*Fig 5.5.1.: Caso EC.1.1
extremidad intervenida*



*Fig 5.5.2.: Caso EC.1.2
Extremidad intervenida*



*Fig 5.5.3.: caso EC.1.1
Extremidad control sin intervenir*

La extremidad control derecha de una rata de esa edad, la observamos en la imagen (Fig 5.5.3). Podemos observar como en la estructura normal del cúbito a nivel de la fisis, este

no presenta ninguna curvatura y como las fisis de ambos huesos cúbito y radio están posicionalmente a igual altura.

Tabla 5.5.1: Medidas en mm y grados de la articulación trasplantada.

	EC.1.1 lzd.	EC.1.2 lzd.	EC.1.3 lzd.	EC.1.4 lzd.	EC.1.5 lzd.	EC.1.6 lzd.	Media	Desvest
LC	26,09	25,97	26,85	23,38	25,89	25,98	25,69	1,19
LR	17,64	17,30	20,59	14,67	17,52	17,23	17,49	1,88
LPR	8,58	9,66	8,57	8,96	9,51	10,20	9,25	0,65
LDR	6,57	5,67	7,51	5,99	6,27	5,67	6,28	0,70
LPI	0,44	2,05	0,52	0,20	0,34	0,56	0,68	0,68
LPM	0,28	0,75	0,33	0,17	0,28	0,26	0,35	0,2
LPE	0,55	1,58	0,56	0,12	0,52	0,41	0,62	0,49
LEI	1,05	1,42	1,12	1,81	1,06	1,36	1,30	0,29
LEE	1,68	1,38	1,35	1,02	1,54	1,35	1,39	0,22
ADR	1,16	1,05	1,38	1,46	1,18	1,02	1,21	0,18
AMR	1,74	2,01	1,95	2,01	1,79	2,01	1,92	0,12
APP	1,89	2,05	1,93	2,10	1,74	2,01	1,95	0,13
APD	2,00	2,13	2,00	2,37	2,00	2,08	2,10	0,15
AEM	2,28	2,21	1,89	2,24	2,28	2,18	2,18	0,15
GDR	154,83	167,55	170,54	153,80	153,10	168,55	161,40	8,27
GDL	169,22	170,64	175,13	165,95	169,14	170,25	170,06	2,98
GDT	84,54	87,84	96,51	72,58	85,54	86,41	85,57	7,69
GDE	167,33	170,48	161,99	176,92	168,20	169,12	169,01	4,85

Casos individualizados de la serie EC con un tiempo de 6 semanas, Sin tratamiento celular

Tabla 5.5.2: Medidas en mm y grados de la articulación control

	EC.1.1 Dech	EC.1.2 Dech	EC.1.3 Dech	EC.1.4 Dech	EC.1.5 Dech	EC.1.6 Dech	Media	Desvest
LC	29,63	28,49	28,70	28,68	28,63	28,51	28,77	0,43
LR	22,83	22,21	22,25	22,28	22,65	22,30	22,42	0,26
LPR	8,89	8,66	10,76	10,37	8,74	8,54	9,33	0,97
LDR	13,88	13,75	11,70	12,01	12,90	13,52	12,96	0,92
LPI	0,56	0,53	0,33	0,35	0,54	0,54	0,47	0,1
LPM	0,35	0,45	0,40	0,29	0,36	0,46	0,38	0,06
LPE	0,73	0,37	0,42	0,15	0,68	0,38	0,46	0,22
LEI	0,91	0,84	0,79	0,72	0,90	0,88	0,84	0,07
LEE	1,24	1,17	1,06	0,97	1,22	1,08	1,12	0,1
ADR	0,84	0,86	1,16	0,92	0,85	0,82	0,91	0,13
AMR	1,47	1,45	2,06	1,34	1,43	1,44	1,53	0,26
APP	1,58	1,42	2,12	1,30	1,54	1,43	1,57	0,29
APD	1,74	1,47	2,22	1,43	1,75	1,48	1,68	0,3
AEM	2,01	1,50	1,91	1,36	2,02	1,50	1,72	0,3
GDR	165,26	156,71	158,96	161,64	165,23	154,20	160,33	4,53
GDL	172,25	169,54	171,51	177,75	172,50	168,30	171,97	3,27
GDT	77,82	92,95	87,60	94,97	78,50	93,50	87,56	7,7
GDE	167,93	160,17	166,80	174,59	168,50	162,10	166,68	5,12

Casos individualizados de la serie EC con un tiempo de 6 semanas, Sin tratamiento celular

Resultados

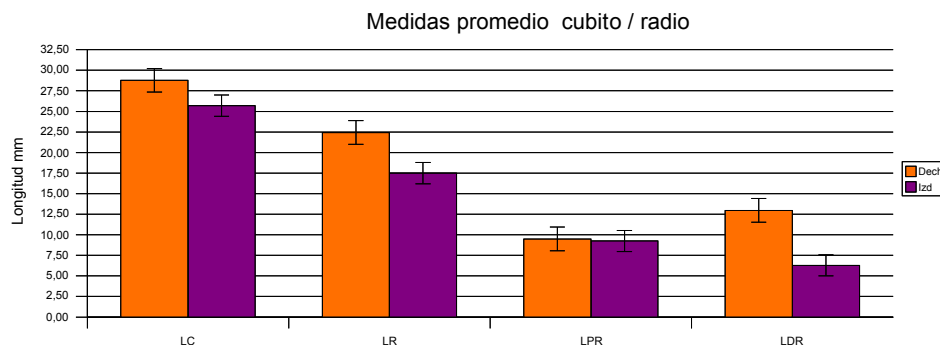
Tabla 5.5.3: Medidas comparativas de las longitudes del cubito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades.

Casos	Long cubito LC		Long radio LR		L prox rad LPR		L dist radio LDR	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.1.1	29,63	26,09	22,83	17,64	9,89	8,58	13,88	6,57
EC.1.2	28,49	25,97	22,21	17,30	8,66	9,66	13,75	5,67
EC.1.3	28,70	26,85	22,25	20,59	10,76	8,57	11,70	7,51
EC.1.4	28,68	23,38	22,28	14,67	10,37	8,96	12,01	5,99
EC.1.5	28,63	25,89	22,65	17,52	8,74	9,51	12,90	6,27
EC.1.6	28,51	25,98	22,30	17,23	8,54	10,2	13,52	5,67
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	6,21	t cal =	6,36	t cal =	0,38	t cal =	11,36

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tiempo 6 semanas, sin tratamiento celular. Los n° expresan medidas reales en mm.

En el análisis estadístico de las longitudes del cúbito, radio, y del eje proximal y distal del radio (Tabla 5.5.3) . Vemos que existen diferencias significativas acusadas ($t_{cal} > t_{tab}$) en las longitudes de radio (LR), cúbito, (LC) y eje distal del radio (LDR) entre la extremidad intervenida y la extremidad control. En el caso del eje distal del radio (LDR) la diferencia es muy acusada, la longitud de este en el control (Dech) es el doble que en la extremidad intervenida (Izd). No existen sin embargo diferencias en el eje proximal del radio, (LPR) zona controlada por la placa proximal del radio.

Ilustración 5.5.1: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía E. Tiempo 6 semanas. Sin tratamiento celular.

En el gráfico 5.5.1, se indican las mediciones promedio de ambas extremidades con un tiempo de 6 semanas, (porcentaje de error del 5 %). Vemos que en la extremidad control derecha, la longitud del eje proximal del radio (LPR) es mas corta que la longitud del eje distal (LDR) y que esto no sucede en la extremidad intervenida.

Tabla 5.5.4: Medidas comparativas de longitudes de la placa del radio en zona interior, media y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.1.1	0,56	0,44	0,35	0,28	0,73	0,55
EC.1.2	0,53	1,05	0,45	0,75	0,37	1,58
EC.1.3	0,33	0,52	0,40	0,33	0,42	0,56
EC.1.4	0,35	0,20	0,29	0,17	0,15	0,12
EC.1.5	0,54	0,34	0,36	0,28	0,68	0,52
EC.1.6	0,54	0,56	0,46	0,26	0,38	0,41
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	0,39	t cal =	0,53	t cal =	0,79

Análisis estadístico mediante prueba *t* de Student. Cirugía E. Tiempo 6 semanas, sin tratamiento celular. Los n° expresan medidas en mm.

Análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.4) de las longitudes de la placa en la zona interior, (LPI) media (LPM) y exterior (LPE). Con respecto a la extremidad control derecha no existen diferencias significativas

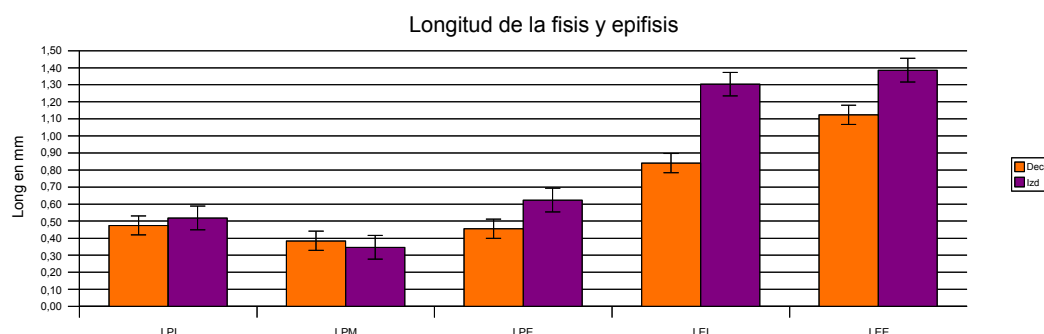
Tabla 5.5.5: Medidas comparativas de longitudes de la epífisis en zona interior y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long epífisis int LEI		Long epífisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.1.1	0,91	1,05	1,24	1,68
EC.1.2	0,84	1,42	1,17	1,38
EC.1.3	0,79	1,12	1,06	1,35
EC.1.4	0,72	1,81	0,97	1,02
EC.1.5	0,90	1,06	1,22	1,54
EC.1.6	0,88	1,36	1,08	1,35
	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	3,23	t cal =	4,84

Análisis estadístico mediante prueba *t* de Student. Cirugía E. Tiempo 6 semanas, sin tratamiento celular. Los n° expresan medidas en mm.

En el análisis estadístico comparativo de las longitudes de la epífisis en la zona interior (LEI) y exterior (LEE), (Tabla 5.5.5), hay diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) entre ambas medidas. La epífisis tiene una mayor longitud en la articulación intervenida.

Ilustración 5.5.2: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía E. Tiempo 6 semanas. Sin tratamiento celular.

Resultados

En el gráfico de la ilustración 5.5.2, se recogen las longitudes promedio de las mediciones en longitud realizadas en la fisis y epífisis. La longitud de la fisis y epífisis es mayor en la extremidad intervenida en todas las mediciones, excepto en la longitud de la zona central de la placa (LPM).

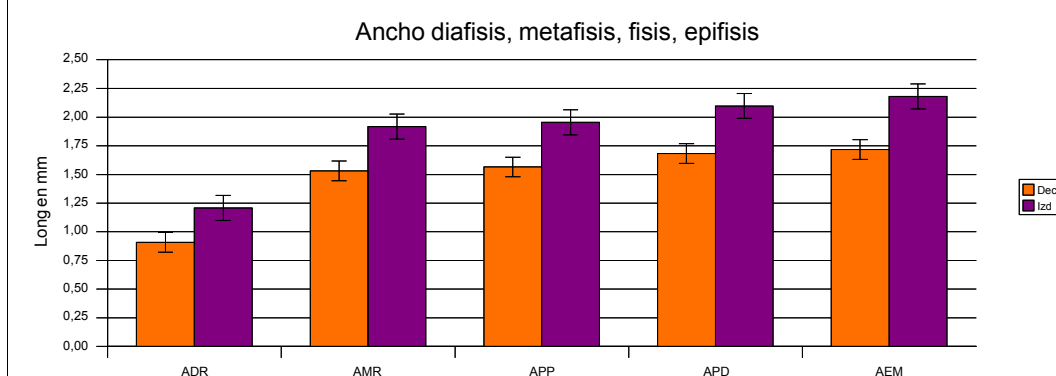
Tabla 5.5.6: Medidas comparativas de anchura de la diáfisis, metáfisis, placa proximal, placa distal y epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMR		A placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	lzd	Dech	lzd	Dech	lzd	Dech	lzd	Dech	lzd
EC.1.1	0,84	1,16	1,47	1,74	1,58	1,89	1,74	2	2,01	2,28
EC.1.2	0,86	1,05	1,45	2,01	1,42	2,05	1,47	2,13	1,50	2,21
EC.1.3	1,16	1,38	2,06	1,95	2,12	1,93	2,22	2	1,91	1,89
EC.1.4	0,92	1,46	1,34	2,01	1,30	2,10	1,43	2,37	1,36	2,24
EC.1.5	0,85	1,18	1,43	1,79	1,54	1,74	1,75	2,00	2,02	2,28
EC.1.6	0,82	1,02	1,44	2,01	1,43	2,01	1,48	2,08	1,5	2,18
	t tab= 2,57		t tab= 2,57		t tab= 2,57		t tab= 2,57		t tab= 2,57	
	t cal = 5,59		t cal = 3,30		t cal = 2,67		t cal = 2,49		t cal = 3,29	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Los n° expresan medidas en mm. Cirugía E. Tiempo 6 semanas, sin tratamiento celular.

En el análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.6) de la anchura de la diáfisis del radio, metáfisis, placa y epífisis vemos que existen diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la anchura de la diáfisis (ADR), metáfisis (AMR) y epífisis (AEM) moderadamente acusadas. En la placa, la diferencia en anchura de la extremidad intervenida es mas moderada, la diferencia es significativa a nivel de la zona proximal. (APP)

Ilustración 5.5.3: Gráfico de las medidas promedio de la anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.



Cirugía E. Tiempo 6 semanas. Sin tratamiento celular.

En el gráfico 5.5.3, las medidas promedio en anchura de la diáfisis, metáfisis, placa proximal, placa distal y epífisis son mayores en la extremidad intervenida que en el control.

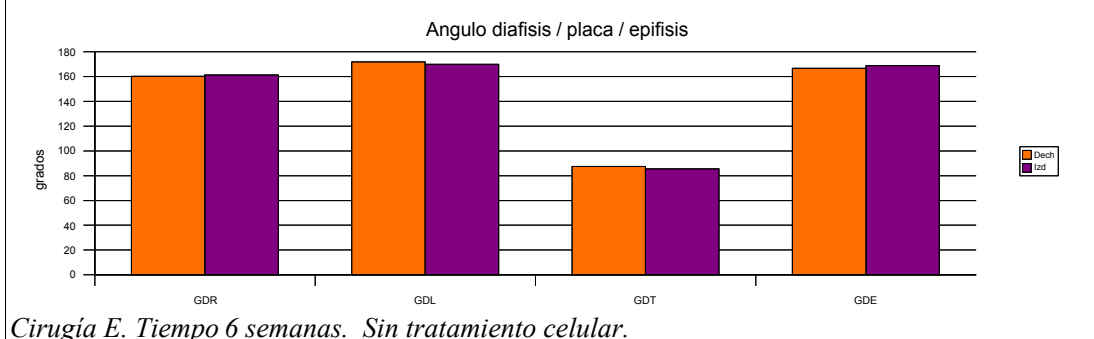
Tabla 5.5.7: Medidas comparativas de los ángulos formados por la diáfisis del radio, ejes de la placa y epífisis de ambas extremidades.

Casos	Ang d/radio GDR		Ang d/placa GLD		Ang d/placa GDT		Ang dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.1.1	165,3	154,8	172,2	169,2	77,8	84,5	167,9	167,3
EC.1.2	156,7	167,6	169,5	170,6	92,9	87,8	160,2	170,5
EC.1.3	159,0	170,5	171,5	175,1	87,6	96,5	166,8	162,0
EC.1.4	161,6	153,8	177,8	166,0	95,0	72,6	174,6	176,9
EC.1.5	165,2	153,1	172,5	169,1	78,5	85,5	168,5	168,2
EC.1.6	154,2	168,6	168,3	170,3	93,5	86,4	162,1	169,1
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	0,21	t cal =	0,84	t cal =	0,40	t cal =	1,03

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tiempo 6 semanas, sin tratamiento celular. Los n° expresan medidas en grados.

En el análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.7) de los ángulos formados por la diáfisis del radio (GDR), eje de la placa longitudinal (GLD), eje de la placa transversal (GDT) y epífisis (GDE) no hay diferencias significativas en ninguno de los casos. Lo que indica que no hay desviación en la mano.

Ilustración 5.5.4: Gráfico de las medidas promedio de los ángulos de la diáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.



En el diagrama de barras de la ilustración 5.5.4, se indican las medias promedio de los ángulos, estas medidas son muy similares para ambas extremidades.

Grupo EC. Tiempo 12 semanas

En este grupo los casos no evolucionan de forma similar, en una valoración conjunta los hemos agrupado en dos tipos de comportamientos.

En unos casos la placa injertada, se ha cerrado dando lugar a un acortamiento claro del

Resultados

crecimiento de la extremidad. El radio no dibuja bien la diáfisis, hay un ensanchamiento de la diáfisis radial, con un estrechamiento a nivel del tercio distal (Fig 5.5.4 y 5.5.5). Este acortamiento del radio produce puede ser moderado (Fig 5.5.4) o muy acusado (Fig 5.5.5), produciendo acortamiento, desviaciones y malformaciones en el crecimiento del cúbito.

En otros casos, donde se observa la zona de la placa, se produce un crecimiento anormal de la epífisis, que origina un menor acortamiento de la extremidad, (Fig 5.5.6). En estos casos las deformaciones de cúbito y radio no son tan acusadas. La fisis del radio esta posicionalmente retrasada, en posición “minus” con respecto a la fisis del cúbito. El cúbito ha crecido más que el radio y hace que la mano se desvíe hacia el radio dando lugar a una mano zamba radial (Fig 5.5.6).

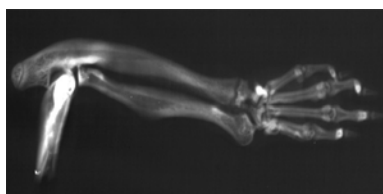


Fig 5.5.4.: Caso EC.2.1



Fig 5.5.5.: Caso EC.2.2

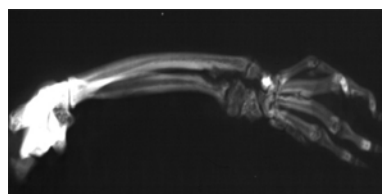


Fig 5.5.6.: Caso EC.2.6

Tabla 5.5.8: Medidas en mm y grados de la articulación trasplantada.

	EC.2.1	EC.2.2	EC.2.3	EC.2.4	EC.2.5	EC.2.6		
	lzd.	lzd.	lzd.	lzd.	lzd.	lzd.	Media	Desvest
LC	28,35	25,04	29,10	27,49	31,11	28,93	28,34	2,01
LR	21,32	17,72	20,81	20,55	24,81	21,00	21,03	2,26
LPR	9,87	7,76	9,64	11,59	10,73	10,12	9,95	1,28
LDR	11,22	9,63	11,16	8,85	14,12	10,68	10,94	1,81
LPI	0,04	0,11	0,13	0,10	0,18	0,05	0,10	0,05
LPM	0,04	0,11	0,20	0,19	0,09	0,24	0,15	0,08
LPE	0,13	0,02	0,18	0,20	0,18	0,23	0,16	0,07
LEI	0,58	0,48	1,50	0,55	0,41	1,34	0,81	0,48
LEE	1,00	1,39	1,47	1,90	0,90	1,57	1,37	0,37
ADR	2,37	3,07	1,63	1,23	1,42	1,27	1,83	0,74
AMR	2,07	2,65	2,60	2,73	1,79	2,44	2,38	0,37
APP	2,38	2,22	2,41	1,91	1,88	1,92	2,12	0,25
APD	2,72	2,22	2,33	1,81	2,33	1,91	2,22	0,33
AEM	2,60	2,33	1,99	1,84	2,26	1,54	2,09	0,38
GDR	171,96	166,58	168,31	162,36	169,09	174,13	168,74	4,13
GDL	158,01	165,99	170,61	170,45	150,18	167,96	163,87	8,15
GDT	103,48	91,80	83,26	85,43	96,14	76,87	89,50	9,59
GDE	149,14	135,44	173,26	166,10	142,97	170,19	156,18	15,75

Casos individualizados de la serie EC . Cirugía E. Tiempo 12 semanas, sin tratamiento celular

Tabla 5.5.9: Medidas en mm y grados de la articulación control.

	EC.2.1	EC.2.2	EC.2.3	EC.2.4	EC.2.5	EC.2.6		
	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Media	Desvest
LC	29,80	31,93	31,92	30,62	32,44	31,36	31,34	0,98
LR	25,06	24,79	24,51	24,34	25,15	24,42	24,71	0,34
LPR	11,51	9,83	11,20	11,17	11,01	10,42	10,86	0,62
LDR	13,63	15,11	13,37	13,30	14,56	14,40	14,06	0,74
LPI	0,26	0,28	0,21	0,39	0,14	0,27	0,26	0,08
LPM	0,28	0,07	0,21	0,22	0,18	0,28	0,21	0,08
LPE	0,37	0,22	0,41	0,52	0,09	0,18	0,30	0,16
LEI	0,73	0,73	0,72	0,65	0,83	0,69	0,73	0,06
LEE	1,23	1,19	1,17	1,03	0,99	1,02	1,10	0,11
ADR	1,06	1,10	1,06	1,23	1,05	0,91	1,07	0,1
AMR	1,62	1,63	1,67	1,83	2,11	1,51	1,73	0,21
APP	1,70	1,58	1,73	1,82	1,94	1,54	1,72	0,15
APD	1,98	1,79	1,90	1,94	1,82	1,88	1,88	0,07
AEM	2,00	1,99	2,04	2,09	1,71	1,55	1,89	0,22
GDR	165,11	166,34	167,20	163,27	159,49	156,98	163,06	4,05
GDL	170,84	175,44	178,43	172,21	171,88	167,26	172,67	3,85
GDT	82,42	81,94	84,06	86,49	86,20	77,06	83,03	3,47
GDE	169,92	167,01	167,51	165,74	164,61	166,08	166,81	1,83

Casos individualizados de la serie EC, cirugía E, con un tiempo de 12 semana, sin tratamiento celular.

Tabla 5.5.10: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades

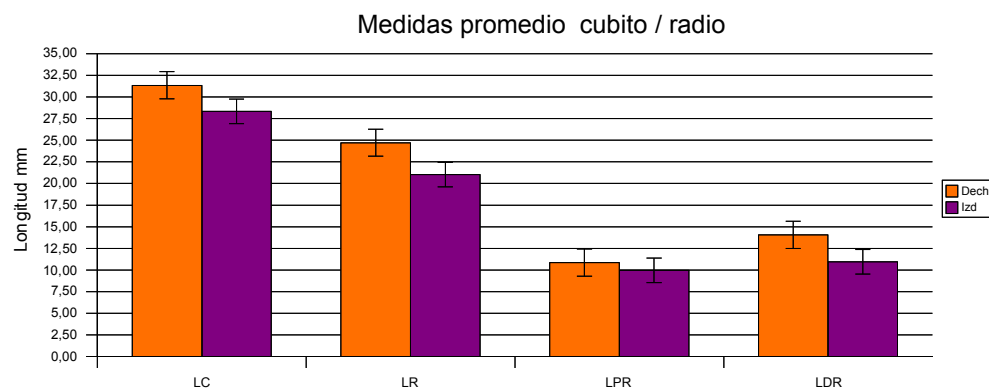
Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.2.1	29,80	28,35	25,06	21,32	11,51	9,87	13,63	11,22
EC.2.2	31,93	25,04	24,79	17,72	9,83	7,76	15,11	9,63
EC.2.3	31,92	29,10	24,51	20,81	11,20	9,64	13,37	11,16
EC.2.4	30,62	27,49	24,34	20,55	11,17	11,59	13,30	8,85
EC.2.5	32,44	31,11	25,15	24,81	11,01	10,73	14,56	14,12
EC.2.6	31,36	28,93	24,42	21,00	10,42	10,12	14,40	10,68
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 3,62		t cal = 4,22		t cal = 2,25		t cal = 4,24	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tiempo 12 semanas, sin tratamiento celular. Los números expresan medidas reales en mm.

Análisis estadístico comparativo de las longitudes del cúbito, radio, y del eje proximal y distal del radio (Tabla 5.5.10). Los resultados son los mismos que los observados en el grupo EC con 6 semanas. Existen diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en las longitudes de radio (LR), cúbito (LC), y eje distal del radio (LDR) entre la mano intervenida y la mano control. No existen sin embargo diferencias en el eje proximal del radio (LPR), zona controlada por la placa proximal del radio.

Resultados

Ilustración 5.5.5: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía E. Tiempo 12 semanas. Sin tratamiento celular.

En el diagrama de barras (ilustración 5.5.5) se muestran las mediciones promedio de ambas manos (porcentaje de error del 5 %). En estos casos las mediciones promedio del eje proximal y distal del radio en la mano intervenida responden a un patrón de normalidad. La longitud del eje distal del radio (LDR) es ligeramente superior en la extremidad intervenida a la longitud del eje proximal (LPR), lo mismo que sucede en la extremidad control.

Tabla 5.5.11: Medidas comparativas de las longitudes de la placa del radio en zona interior, media y exterior de ambas extremidades

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.2.1	0,26	0,04	0,28	0,04	0,37	0,13
EC.2.2	0,28	0,11	0,07	0,11	0,22	0,02
EC.2.3	0,21	0,13	0,21	0,2	0,41	0,18
EC.2.4	0,39	0,10	0,22	0,19	0,52	0,20
EC.2.5	0,14	0,18	0,18	0,09	0,09	0,18
EC.2.6	0,27	0,05	0,28	0,24	0,18	0,23
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	3,10	t cal =	1,48	t cal =	2,06

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tiempo 12 semanas, sin tratamiento celular. Los n° expresan medidas en mm.

Análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.11) de las longitudes de la placa en la zona interior (LPI) media (LPM) y exterior (LPE), para un tiempo de 12 semanas. Con respecto a la extremidad control derecha, vemos que existen diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la longitud de la placa interior.

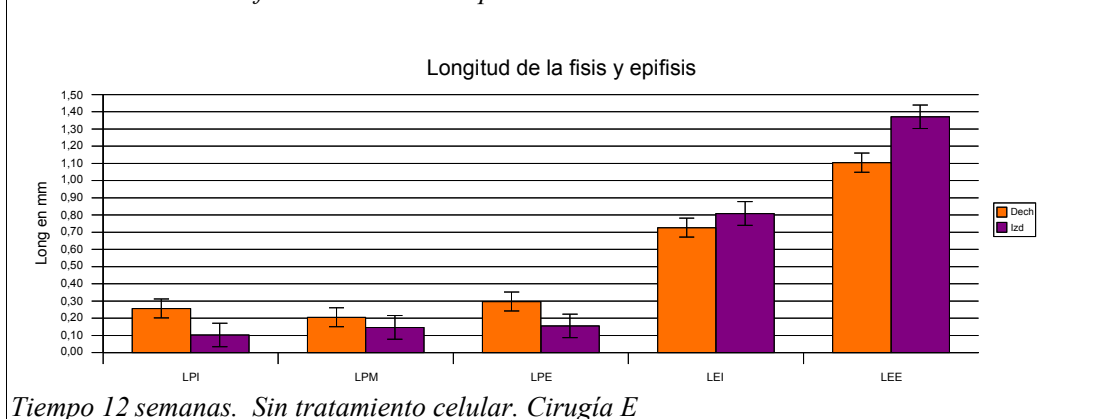
Tabla 5.5.12: Medidas comparativas de longitudes de la placa en zona interior, media y exterior de ambas extremidades

Casos	Long epifisis int LEI		Long epifisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.2.1	0,73	0,58	1,23	1,00
EC.2.2	0,73	0,48	1,19	1,39
EC.2.3	0,72	1,50	1,17	1,47
EC.2.4	0,65	0,55	1,03	1,90
EC.2.5	0,83	0,41	0,99	0,90
EC.2.6	0,69	1,34	1,02	1,57
	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	0,40	t cal =	1,60

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tiempo 12 semanas, sin tratamiento celular. Los n° expresan medidas en mm.

Análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.12) de las longitudes de la epífisis en la zona interior (LEI) y exterior (LEE). Aunque las diferencias no son significativas debido a la disparidad de los casos, podemos observar ese crecimiento anormal de la epífisis en la extremidad intervenida, indicado en la observación radiológica conjunta y reflejado aquí de forma individual en los casos EC.2.3 y EC.2.6.

Ilustración 5.5.6: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.6) se indican las mediciones promedio de ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). La longitud de la fisis es menor en la extremidad intervenida que la extremidad control, en las 3 zonas medidas, interior, media y externa. La longitud de la epífisis es mayor en cambio en la extremidad intervenida que en la extremidad control.

Resultados

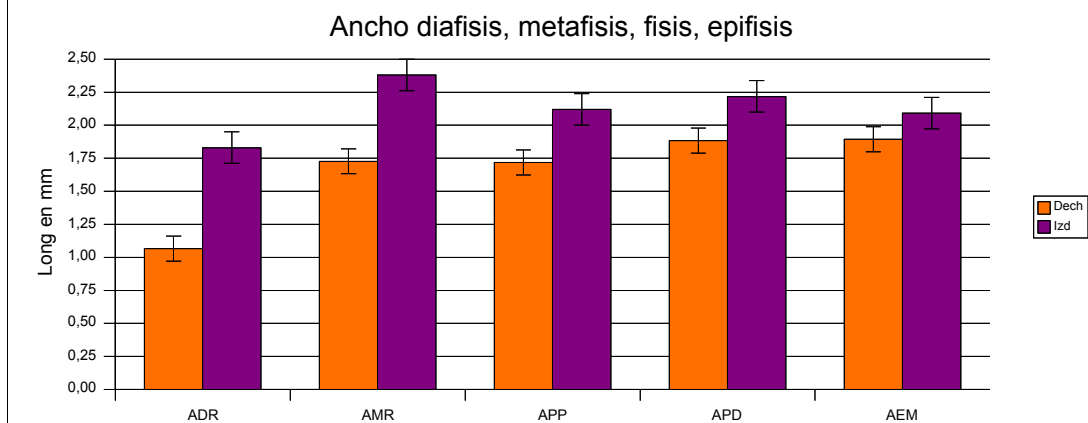
Tabla 5.5.13: Medidas comparativas de anchura de la diáfisis, metáfisis, placa proximal, placa distal y epífisis de ambas extremidades

Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMR		A placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.2.1	1,06	2,37	1,62	2,07	1,70	2,38	1,98	2,72	2,00	2,60
EC.2.2	1,10	3,07	1,63	2,65	1,58	2,22	1,79	2,22	1,99	2,33
EC.2.3	1,06	1,63	1,67	2,6	1,73	2,41	1,90	2,33	2,04	1,99
EC.2.4	1,23	1,23	1,83	2,73	1,82	1,91	1,94	1,81	2,09	1,84
EC.2.5	1,05	1,42	2,11	1,79	1,94	1,88	1,82	2,33	1,71	2,26
EC.2.6	0,91	1,27	1,51	2,44	1,54	1,92	1,88	1,91	1,55	1,54
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	2,55	t cal =	3,11	t cal =	3,09	t cal =	2,54	t cal =	1,37

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E Tiempo 12 semanas, sin tratamiento celular. Los números expresan medidas en mm.

En el análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.13) de la anchura de la diáfisis del radio (ADR), metáfisis (AMR), epífisis (AEM) y placa proximal (APP) y placa distal (APD), existen diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la anchura de la metáfisis (AMR) y en la anchura de la placa de la zona proximal (APP) aunque no muy acusadas.

Ilustración 5.5.7: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía E. Tiempo 12 semanas. Sin tratamiento celular.

En la ilustración 5.5.7, la imagen representa las medidas promedio en anchura de la articulación a las 12 semanas. Todas las mediciones en anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis, son mayores en la extremidad intervenida, (izq), que en el control (dech)

Tabla 5.5.14: Medidas comparativas de los ángulos de los ejes de la diáfisis, de esta con el eje de la placa longitudinal y transversal y con el eje longitudinal de la epífisis de ambas extremidades.

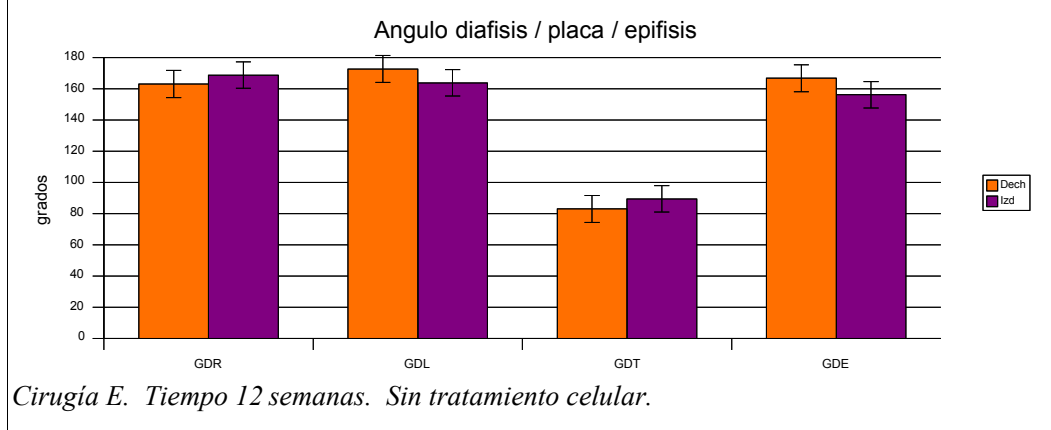
Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.2.1	165,1	172,0	170,8	158,0	82,4	103,5	169,9	149,1
EC.2.2	166,3	166,6	175,4	166,0	81,9	91,8	167,0	135,4
EC.2.3	167,2	168,3	178,4	170,6	84,1	83,3	167,5	173,3
EC.2.4	163,3	162,4	172,2	170,5	86,5	85,4	165,7	166,1
EC.2.5	159,5	169,1	171,9	150,2	86,2	96,1	164,6	143,0
EC.2.6	157,0	174,1	167,3	168,0	77,1	76,9	166,1	170,2
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	2,00	t cal =	2,68	t cal =	1,79	t cal =	1,63

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E Tiempo 12 semanas, sin tratamiento celular. Los numero son medidas en grados.

Análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.14) de los ángulos formados por el eje de la diáfisis del radio (GDR), ejes longitudinal (GLD) y transversal (GDT) de la placa y eje de la epífisis (GDE).

Observamos diferencias significativas en el angulo diáfisis/eje longitudinal de la placa, lo que corrobora la observación radiológica cualitativa, en alguno de los casos, de “mano zamba”, cuando el eje se desvía hacia la posición del radio.

Ilustración 5.5.8: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico de la ilustración 5.5.8, se indican las medidas promedio de los ángulos de los ejes de diáfisis, placa y epífisis.

Grupo EC. Tiempo 24 semanas

En este grupo lo más destacado es que no hay desviaciones ni malformaciones grandes en la extremidad. Hay un acortamiento del radio y del cúbito pero en ninguno de los casos se ha producido una desviación originando una mano zamba radial.

La placa injertada se ha cerrado como corresponde a la edad del animal pero ha estado funcionado dando lugar a un crecimiento óseo. La imagen radiológica del radio, muestra una alteración ósea, el eje distal del radio no se dibuja bien, se alternan zonas de distinta opacidad. Las corticales de esta zona tienen una mayor condensación (Fig 5.5.7 y 5.5.8), no son homogéneas en toda su extensión y presentan zonas radio-translúcidas en la zona externa por ejemplo (Fig 5.5.9), la zona medular es mas translúcida, esto se podría atribuir a deficiencia en la osificación.

Destaca el puente óseo situado a nivel de la diáfisis media del radio, que se observa como una discontinuidad en el hueso (Fig 5.5.7) y que sugiere la zona de unión entre la metáfisis y el injerto en el momento del trasplante.

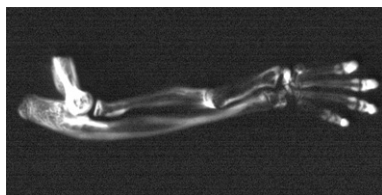


Fig 5.5.7. Caso EC.3.2

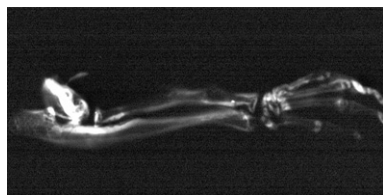


Fig 5.5.8. Caso EC.3.5

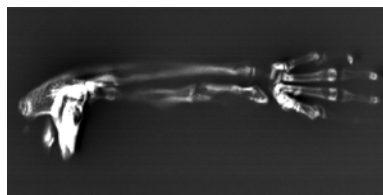


Fig 5.5.9. Caso EC.3.6

Tabla 5.5.15: Medidas en mm y grados de la articulación trasplantada.

	EC.3.1 lzd.	EC.3.2 lzd.	EC.3.3 lzd.	EC.3.4 lzd.	EC.3.5 lzd.	EC.3.6 lzd.	Media	Desvest
LC	30,79	25,87	27,28	27,87	26,29	28,49	27,76	1,77
LR	24,44	20,80	19,55	21,23	17,17	20,30	20,58	2,37
LPR	9,01	9,27	11,98	8,67	9,39	10,44	9,79	1,22
LDR	15,18	11,59	7,67	12,37	7,84	9,66	10,72	2,90
LPI	0,10	0,11	0,15	0,65	0,56	0,10	0,28	0,26
LPM	0,06	0,15	0,26	0,47	0,42	0,05	0,23	0,18
LPE	0,13	0,11	0,39	0,43	0,49	0,10	0,27	0,18
LEI	0,38	0,59	0,49	0,70	0,33	0,39	0,48	0,14
LEE	0,76	1,00	1,21	0,70	0,25	1,08	0,83	0,34
ADR	1,01	0,88	1,29	1,86	1,26	1,53	1,30	0,35
AMR	1,76	1,47	2,08	1,89	1,78	0,93	1,65	0,40
APP	2,00	1,64	1,77	1,94	1,80	1,14	1,71	0,31
APD	2,21	1,66	1,98	1,76	1,72	1,35	1,78	0,29
AEM	2,24	1,91	1,89	1,47	1,71	1,49	1,78	0,29
GDR	163,94	173,60	165,74	177,22	161,85	174,90	169,54	6,47
GDL	153,72	174,59	82,84	163,97	170,57	172,93	153,10	35,26
GDT	69,05	93,63	179,65	66,53	83,98	102,88	99,29	41,77
GDE	144,81	167,62	176,92	163,24	159,41	160,99	162,17	10,57

Casos individualizados de la serie EC con un tiempo de 24 semanas

Tabla 5.5.16: Medidas en mm y grados de la articulación control.

	EC.3.1	EC.3.2	EC.3.3	EC.3.4	EC.3.5	EC.3.6	Media	Desvest
	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech		
LC	32,24	30,20	31,51	31,46	30,37	31,42	31,20	0,77
LR	25,34	23,16	24,37	24,38	24,94	24,76	24,49	0,75
LPR	10,18	7,97	9,55	9,95	10,57	10,66	9,81	0,99
LDR	15,35	15,25	14,85	14,39	14,40	14,06	14,71	0,52
LPI	0,13	0,15	0,05	0,16	0,17	0,15	0,13	0,04
LPM	0,15	0,11	0,03	0,12	0,10	0,11	0,10	0,04
LPE	0,08	0,12	0,08	0,12	0,10	0,10	0,10	0,02
LEI	0,72	0,53	0,70	0,77	0,61	0,50	0,64	0,11
LEE	0,99	1,13	0,97	1,00	1,05	1,05	1,03	0,06
ADR	0,95	0,88	0,98	0,96	0,92	1,03	0,95	0,05
AMR	1,64	1,68	1,29	1,42	1,55	1,62	1,53	0,15
APP	1,79	1,48	1,33	1,24	1,58	1,68	1,51	0,21
APD	1,69	1,62	1,39	1,39	1,68	1,81	1,60	0,17
AEM	1,57	1,40	1,33	1,38	1,71	1,66	1,51	0,16
GDR	161,61	161,00	163,78	166,57	167,35	166,02	164,39	2,68
GDL	173,62	169,29	177,73	171,87	172,23	167,12	171,98	3,65
GDT	87,48	86,22	94,12	93,38	86,15	88,40	89,29	3,56
GDE	166,15	165,35	172,72	167,19	169,81	160,49	166,95	4,16

Casos individualizados de la serie EC con un tiempo de 24 semanas

Tabla 5.5.17: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades

Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.3.1	32,24	30,79	25,34	24,44	10,18	9,01	15,35	15,18
EC.3.2	30,20	25,87	23,16	20,80	7,97	9,27	15,25	11,59
EC.3.3	31,51	27,28	24,37	19,55	9,55	11,98	14,85	7,67
EC.3.4	31,46	27,87	24,38	21,23	9,95	8,67	14,39	12,37
EC.3.5	30,37	26,29	24,94	17,17	10,57	9,39	14,40	7,84
EC.3.6	31,42	28,49	24,76	20,30	10,66	10,44	14,06	9,66
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 7,64		t cal = 4,04		t cal = 0,03		t cal = 3,67	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tiempo 24 semanas. Sin tratamiento celular. Los números expresan medidas reales en mm.

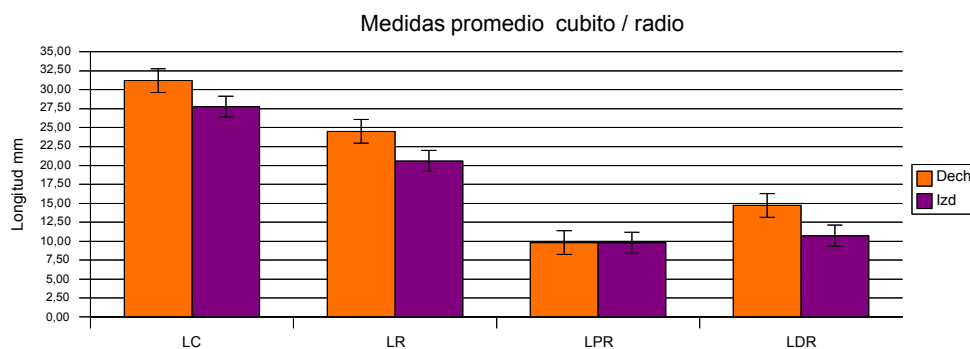
Análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.17) de las longitudes del cúbito (LC), radio (LR), eje proximal (LPR) y distal del radio (LDR).

Los resultados son los mismos que los observados en el grupo EC con 6 y 12 semanas. Existen diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en las longitudes de radio, cúbito, y eje distal del radio entre la mano intervenida y la mano control. No existen diferencias en el eje proximal del radio, zona controlada por la placa proximal del radio.

Resultados

Hay que destacar la diferencia más acusada en este grupo en la longitud de cúbito, debido al menor crecimiento de la extremidad. La medición aquí se ha realizado a las 24 semanas y la diferencia de crecimiento entre la mano intervenida y control es aun mayor .

Ilustración 5.5.9: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía E. Sin tratamiento celular. Tiempo 24semanas

El diagrama de barras (ilustración 5.5.9) muestra las mediciones promedio de ambas manos (porcentaje de error del 5 %). En estos casos las mediciones promedio del eje proximal y distal del radio en la mano intervenida responden más a un patrón de normalidad. La longitud del eje distal del radio (LDR) es ligeramente superior en la extremidad intervenida a la longitud del eje proximal (LPR), lo mismo que sucede en la extremidad control.

Tabla 5.5.18: Medidas comparativas de las longitudes de la placa del radio en zona interior, media y exterior de ambas extremidades

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.3.1	0,13	0,10	0,15	0,06	0,08	0,13
EC.3.2	0,15	0,11	0,11	0,15	0,12	0,11
EC.3.3	0,05	0,15	0,03	0,26	0,08	0,39
EC.3.4	0,16	0,65	0,12	0,47	0,12	0,43
EC.3.5	0,17	0,56	0,10	0,42	0,10	0,49
EC.3.6	0,15	0,10	0,11	0,05	0,10	0,10
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	1,50	t cal =	1,68	t cal =	2,38

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Los n° expresan medidas en mm. Cirugía E. Sin tratamiento celular. Tiempo 24 semanas

Análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.18) de las longitudes de la placa en la zona interior, media y exterior, para un tiempo de 24 semanas. Con respecto a la extremidad control derecha, vemos que no existen diferencias significativas en ninguna de las longitudes de la placa.

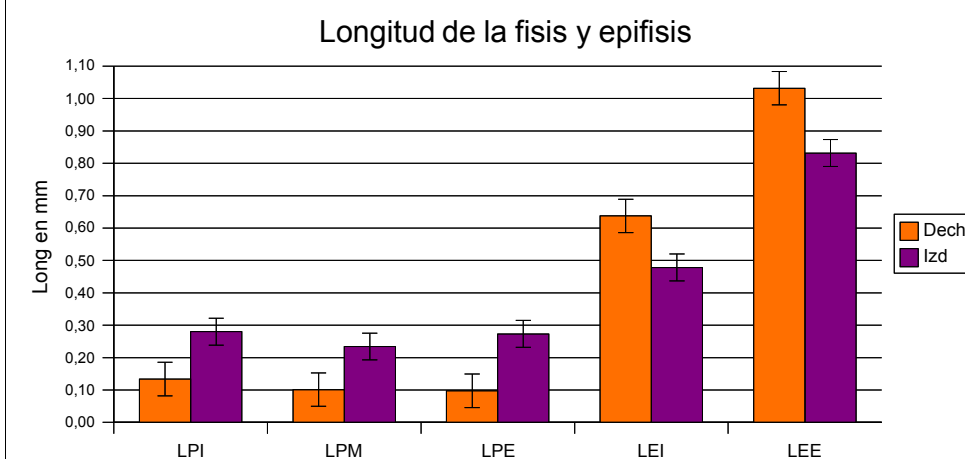
Tabla 5.5.19: Medidas comparativas de las longitudes de la epífisis del radio en zona interior y exterior de ambas extremidades

Casos	Long epifisis int LEI		Long epifisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.3.1	0,72	0,38	0,99	0,76
EC.3.2	0,53	0,59	1,13	1,00
EC.3.3	0,70	0,49	0,97	1,21
EC.3.4	0,77	0,70	1,00	0,70
EC.3.5	0,61	0,33	1,05	0,25
EC.3.6	0,50	0,39	1,05	1,08
	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	2,64	t cal =	1,40

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Los n° expresan medidas en mm. Cirugía E, sin tratamiento celular. Tiempo 24 semanas

Análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.19) de las longitudes de la epífisis en la zona interior (LEI) y exterior (LEE). En este caso hay diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) moderadas en la longitud de la epífisis interior. La longitud de la epífisis es menor en la extremidad intervenida que en el control.

Ilustración 5.5.10: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía E, sin tratamiento celular. Tiempo 24 semanas

En el gráfico (Ilustración 5.5.10) se indican las mediciones promedio de la longitud de la fisis y epífisis de ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %).

Llama la atención que la longitud de la fisis sea mayor en la extremidad intervenida que la extremidad control, en las 3 zonas medidas, interior, media y externa en este tiempo de valoración de 24 semanas post-intervención.

Resultados

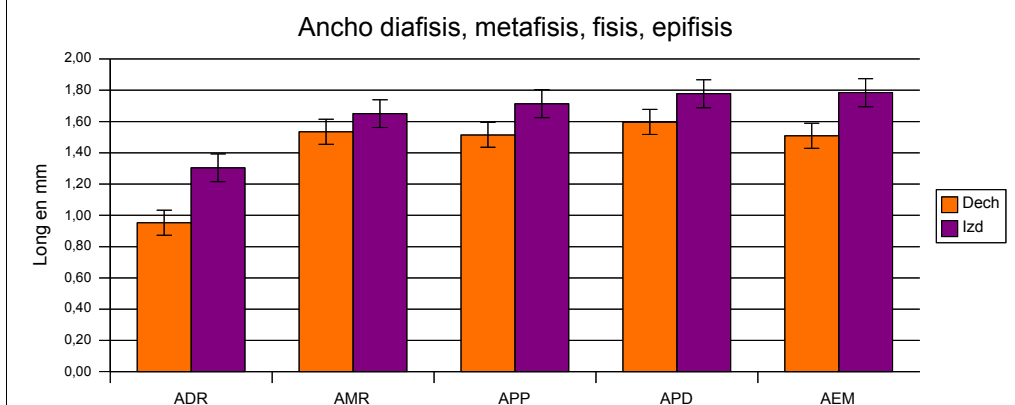
Tabla 5.5.20: Medidas comparativas de anchura de la diáfisis, metáfisis, placa proximal, placa distal y epífisis de ambas extremidades

Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMR		A placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.3.1	0,95	1,01	1,64	1,76	1,79	2,00	1,69	2,21	1,57	2,24
EC.3.2	0,88	0,88	1,68	1,47	1,48	1,64	1,62	1,66	1,40	1,91
EC.3.3	0,98	1,29	1,29	2,08	1,33	1,77	1,39	1,98	1,33	1,89
EC.3.4	0,96	1,86	1,42	1,89	1,24	1,94	1,39	1,76	1,38	1,47
EC.3.5	0,92	1,26	1,55	1,78	1,58	1,80	1,68	1,72	1,71	1,71
EC.3.6	1,03	1,53	1,62	0,93	1,68	1,14	1,81	1,35	1,66	1,49
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 2,65		t cal = 0,55		t cal = 1,18		t cal = 1,13		t cal = 1,95	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Los n° expresan medidas en mm. Tiempo 24 semanas, Cirugía E, sin tratamiento celular.

En el análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.20) de la anchura de la diáfisis del radio, metáfisis, epífisis y placa, existen diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la anchura de la diáfisis (ADR) aunque no muy acusadas.

Ilustración 5.5.11: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Tiempo 24 semanas. Cirugía E, sin tratamiento celular.

En la ilustración 5.5.11 el diagrama representa las medidas promedio en anchura de la articulación a las 24 semanas. Todas las mediciones en anchura son mayores en la extremidad intervenida, izquierda, que en el control. Este resultado ha sido observado igual para las valoraciones a las 6 y 12 semanas dentro de esta misma serie de ensayos.

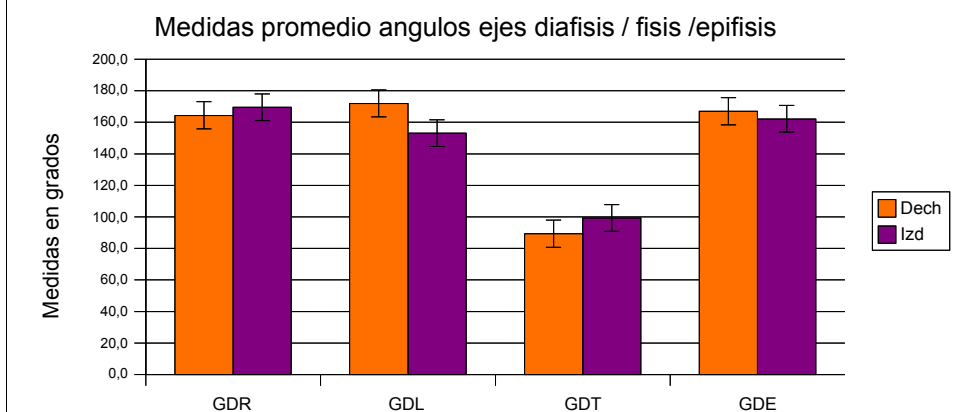
Tabla 5.5.21: Medidas comparativas de los ángulos de los ejes de la diáfisis, de esta con el eje de la placa longitudinal y transversal y con el eje longitudinal de la epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
EC.3.1	161,6	163,9	173,6	153,7	87,5	69,1	166,2	144,8
EC.3.2	161,0	173,6	169,3	174,6	86,2	93,6	165,3	167,6
EC.3.3	163,8	165,7	177,7	82,8	94,1	179,6	172,7	176,9
EC.3.4	166,6	177,2	171,9	164,0	93,4	66,5	167,2	163,2
EC.3.5	167,4	161,8	172,2	170,6	86,1	84,0	169,8	159,4
EC.3.6	166,0	174,9	167,1	172,9	88,4	102,9	160,5	161,0
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	1,86	t cal =	1,20	t cal =	0,61	t cal =	1,22

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Los n° son medidas en grados. Tiempo 12 semanas. Cirugía E, sin tratamiento celular.

Análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.21) de los ángulos formados por el eje de la diáfisis del radio (GDR), ejes longitudinal (GLD) y transversal (GDT) de la placa y eje de la epífisis (GDE). Observamos que no hay diferencias significativas en ninguno de los ángulos, lo que corrobora la observación radiológica cualitativa, en que en ninguno de los casos se ha observado la “mano zamba”.

Ilustración 5.5.12: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Tiempo 24 semanas Cirugía E, sin tratamiento celular.

En el gráfico de la ilustración 5.5.12, se indican las medidas promedio de los ángulos. Estas son similares para ambas extremidades.

5.5.2 Serie E0. Con células MSC

Esta serie se corresponde con animales a los que se les realizó el trasplante de la fisis radial sola, se injertó la placa con su anillo pericondral sin ningún resto de hueso metafisario y recibieron tratamiento sistémico con células MSC en el momento del trasplante.

Grupo E0. Tiempo 6 semanas

Caso: E0.1.1: Radiológicamente se observa una ligera desviación radial produciendo “mano zamba” radial. La fisis del radio se encuentra en posición “minus” con respecto a la fisis del cúbito. Hay una zona irregular en la zona metafisaria radial que hace una impronta en el cúbito produciendo una ligera curvatura. La zona radio-transparente que correspondería a la placa es irregular. Hay una zona radio-condensante en la metáfisis que es irregular. No se dibuja bien la diáfisis, hay un estrechamiento de la diáfisis en el tercio medio. Hay irregularidades en las corticales de la metáfisis y diáfisis en el tercio medio distal. (Fig 5.5.10)

Caso: E0.1.2: Epífisis al mismo nivel, quizás la del radio ligeramente adelantada. Radiológicamente se observa que en este caso la desviación de la mano es cubital, mano zamba cubital. Fisis de radio en posición “plus”, adelantada con respecto a la fisis cubital. Anomalías corticales en cúbito y radio en el tercio distal. (Fig 5.5.11)

Caso: E0.1.3. Radiológicamente en este caso no se aprecia desviación radial ni cubital de la mano, se aprecia una imagen de fisis en “plus” en el radio, con respecto al cúbito, con un ensanchamiento metafisario. Hay un ensanchamiento en el tercio inferior del radio. Sin alteraciones óseas significativas (Fig 5.5.12)

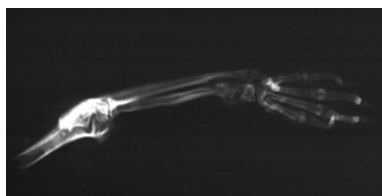


Fig 5.5.10.: Caso E0.1.1

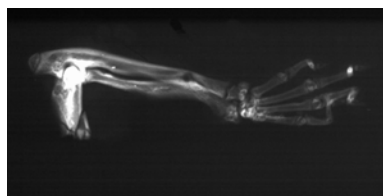


Fig 5.5.11.: Caso E0.1.2

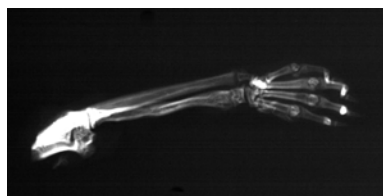


Fig 5.5.12.: Caso E0.1.3

Caso E0.1.4: Radiológicamente no se observa desviación radial ni cubital. La fisis radial está discretamente en posición “minus” con respecto a la fisis cubital, con irregularidades en zona metafisaria. No hay ensanchamiento de la metáfisis sino al contrario lo que se aprecia es una metáfisis en forma de embudo. Se observan zonas radio-condensantes

en zona adyacente a la metáfisis. (Fig 5.5.13)

Caso E0.1.5: Radiológicamente se observa una discreta desviación radial. La epífisis del radio se aprecia como discretamente irregular. La fisis radial es normal en la zona cubital pero en la mitad externa de la placa hay una cierta distorsión, con un ensanchamiento de la metáfisis. La placa radial parece que está al mismo nivel que la cubital. (Fig 5.5.14)

Caso: E0.1.6: Radiológicamente se observa una fisis discretamente “plus” en el radio, con ligero ensanchamiento metafisario, podríamos decir que es un caso radiológicamente normal. Sin otras alteraciones óseas significativas. (Fig 5.5.15)

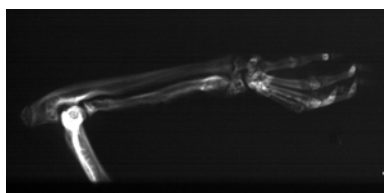


Fig 5.5.13.: Caso E0.1.4

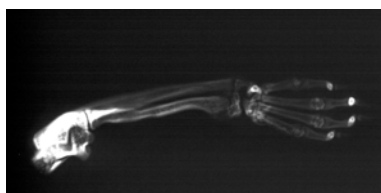


Fig 5.5.14.: Caso E0.1.5

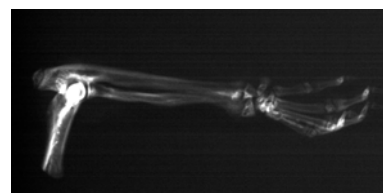


Fig 5.5.15.: Caso E0.1.6

Tabla 5.5.22: Medidas de la articulación trasplantada.

	E0.1.1 lzd.	E0.1.2 lzd.	E0.1.3 lzd.	E0.1.4 lzd.	E0.1.5 lzd.	E0.1.6 lzd.	Media	Desvest
LC	24,94	24,92	27,18	25,52	25,93	25,42	25,65	0,84
LR	17,48	18,88	18,47	17,51	17,64	19,06	18,17	0,72
LPR	12,16	12,66	8,73	8,48	12,04	9,58	10,61	1,89
LDR	5,36	6,52	9,70	8,94	5,63	9,51	7,61	2,00
LPI	0,55	0,24	0,15	0,74	0,70	0,42	0,47	0,24
LPM	0,51	0,10	0,28	0,33	0,42	0,28	0,32	0,14
LPE	0,92	0,25	0,22	0,54	0,80	0,39	0,52	0,29
LEI	1,16	1,01	1,39	0,80	0,80	0,59	0,96	0,29
LEE	1,63	1,22	1,31	1,61	1,22	1,25	1,37	0,19
ADR	0,89	1,84	1,06	1,22	1,06	1,28	1,23	0,33
AMR	2,14	1,93	1,99	1,26	1,71	1,62	1,78	0,32
APP	2,06	1,66	1,92	1,41	1,80	1,44	1,72	0,26
APD	2,01	1,92	1,83	1,39	2,19	1,81	1,86	0,27
AEM	1,71	2,09	1,85	2,00	2,25	1,95	1,98	0,19
GDR	162,53	159,00	172,15	177,44	163,16	176,26	168,42	7,85
GDL	171,02	169,89	173,71	167,47	176,98	170,36	171,57	3,33
GDT	69,27	101,77	97,61	66,89	73,51	77,63	81,11	14,91
GDE	166,58	166,69	175,89	168,69	172,18	166,67	169,45	3,82

Casos de la serie E, con células MSC en el momento del trasplante y un tiempo de 6 semanas.

Resultados

Tabla 5.5.23: Medidas de la articulación control.

	E0.1.1 Dech	E0.1.2 Dech	E0.1.3 Dech	E0.1.4 Dech	E0.1.5 Dech	E0.1.6 Dech	Media	Desvest
LC	27,10	28,38	28,14	27,76	28,06	27,61	27,84	0,46
LR	21,01	21,13	21,09	21,12	21,48	21,67	21,25	0,26
LPR	10,05	8,95	9,19	10,12	9,16	8,46	9,32	0,65
LDR	11,06	12,21	12,14	11,31	12,33	13,33	12,06	0,81
LPI	0,34	0,43	0,47	0,55	0,42	0,45	0,44	0,07
LPM	0,28	0,30	0,30	0,37	0,23	0,31	0,30	0,05
LPE	0,44	0,19	0,64	0,49	0,37	0,35	0,41	0,15
LEI	0,85	0,81	0,70	0,68	0,80	0,63	0,75	0,09
LEE	1,15	1,25	1,11	0,96	1,09	1,01	1,10	0,1
ADR	0,92	1,18	1,10	1,07	0,93	0,90	1,02	0,12
AMR	1,57	1,86	1,84	1,61	1,72	1,57	1,70	0,13
APP	1,58	2,08	1,90	1,56	1,77	1,64	1,76	0,2
APD	1,68	2,09	1,80	1,80	2,01	1,47	1,81	0,22
AEM	1,82	2,04	1,96	1,83	2,07	1,40	1,85	0,25
GDR	165,41	166,00	159,12	162,85	165,10	164,06	163,76	2,53
GDL	172,25	169,86	171,99	175,25	177,61	172,24	173,20	2,76
GDT	79,49	80,33	86,78	84,71	85,09	82,41	83,13	2,87
GDE	170,63	167,20	169,14	171,70	173,08	163,81	169,26	3,36

Casos de la serie E, con células MSC en el momento del trasplante y un tiempo de 6 semanas.

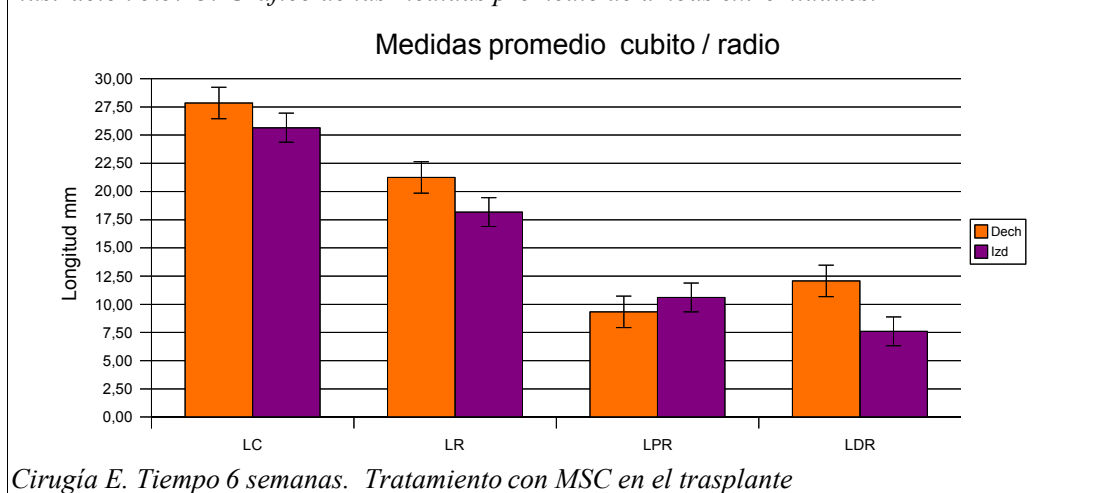
Tabla 5.5.24: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades.

Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.1.1	27,10	24,94	21,01	17,48	10,05	12,16	11,06	5,36
E0.1.2	28,38	24,92	21,13	18,88	8,95	12,66	12,21	6,52
E0.1.3	28,14	27,18	21,09	18,47	9,19	8,73	12,14	9,7
E0.1.4	27,76	25,52	21,12	17,51	10,12	8,48	11,31	8,94
E0.1.5	28,06	25,93	21,48	17,64	9,16	12,04	12,33	5,63
E0.1.6	27,61	25,42	21,67	19,06	8,46	9,58	13,33	9,51
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 6,78		t cal = 11,41		t cal = 1,55		t cal = 5,93	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 6 semanas. Los números expresan medidas reales en mm.

Análisis estadístico comparativo de las longitudes del cúbito, radio, y lo que hemos definido como eje proximal y distal del radio. (Tabla 5.5.24). Existen diferencias significativas acusadas ($t_{cal} > t_{tab}$) en las longitudes de radio, cúbito, y eje distal del radio entre la mano intervenida y la mano control. No existen sin embargo diferencias significativas en la longitud del eje proximal del radio, zona controlada por la placa proximal del radio.

Ilustración 5.5.13: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico de la ilustración 5.5.13, se indican las medidas promedio de ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). Las longitudes de cúbito (LC) radio (LR) y eje distal del radio (LDR) son mayores en la extremidad control, pero no ocurre lo mismo con la longitud del eje proximal del radio (LPR) que es mayor en la mano intervenida

Tabla 5.5.25: Medidas comparativas de las longitudes de la fisis radial en la zona interior, media y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.1.1	0,34	0,55	0,28	0,51	0,44	0,92
E0.1.2	0,43	0,24	0,30	0,10	0,19	0,25
E0.1.3	0,47	0,15	0,30	0,28	0,64	0,22
E0.1.4	0,55	0,74	0,37	0,33	0,49	0,54
E0.1.5	0,42	0,70	0,23	0,42	0,37	0,80
E0.1.6	0,45	0,42	0,31	0,28	0,35	0,39
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	0,24	t cal =	0,33	t cal =	0,80

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 6 semanas. Los números expresan medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de la Tabla 5.5.25, nos muestra las longitudes de la placa en la zona interior, media y exterior. No existen diferencias significativas en ninguno de los casos.

Resultados

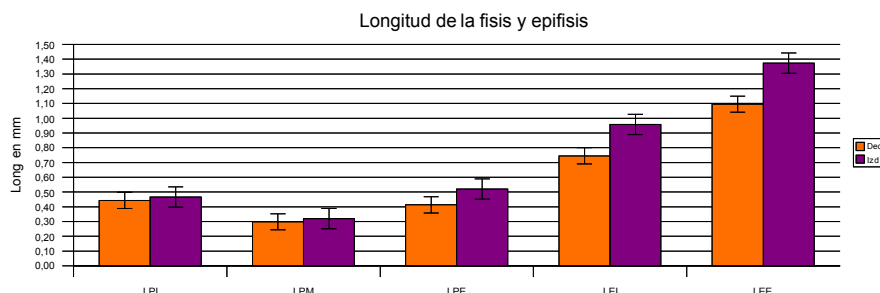
Tabla 5.5.26: Medidas de longitud de epífisis radial zona interior, y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long epífisis int LEI		Long epífisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.1.1	0,85	1,16	1,15	1,63
E0.1.2	0,81	1,01	1,25	1,22
E0.1.3	0,70	1,39	1,11	1,31
E0.1.4	0,68	0,80	0,96	1,61
E0.1.5	0,80	0,80	1,09	1,22
E0.1.6	0,63	0,59	1,01	1,25
	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	1,96	t cal =	2,77

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 6 semanas. Los n° expresan medidas reales en mm.

En la tabla 5.5.26, el análisis estadístico comparativo de las longitudes de la epífisis en la zona interior (LEI) y exterior (LEE) nos muestra la longitud significativamente mayor en la zona externa de la epífisis (LEE) aunque esta diferencia no es muy acusada.

Ilustración 5.5.14: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Tiempo 6 semanas. Cirugía E. Tratamiento con MSC en el trasplante

El diagrama de barras, 5.5.14, muestra que tanto la fisis en todas las zonas medidas, como la epífisis, son mayores en la extremidad intervenida (porcentaje de error del 5 %).

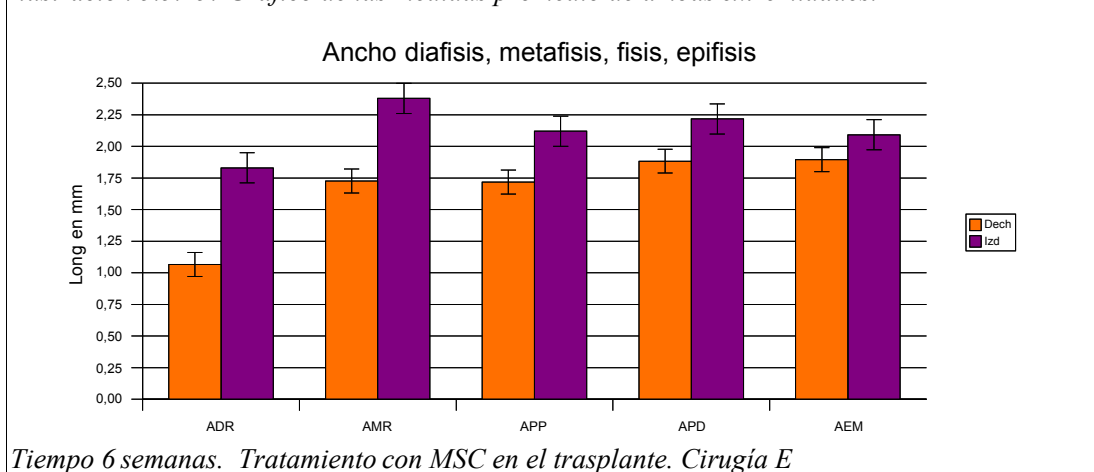
Tabla 5.5.27: Medidas comparativas de anchura de la diáfisis, metáfisis, placa proximal, placa distal y epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMR		A placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.1.1	0,92	0,89	1,57	2,14	1,58	2,06	1,68	2,01	1,82	1,71
E0.1.2	1,18	1,84	1,86	1,93	2,08	1,66	2,09	1,92	2,04	2,09
E0.1.3	1,10	1,06	1,84	1,99	1,90	1,92	1,80	1,83	1,96	1,85
E0.1.4	1,07	1,22	1,61	1,26	1,56	1,41	1,80	1,39	1,83	2,00
E0.1.5	0,93	1,06	1,72	1,71	1,77	1,80	2,01	2,19	2,07	2,25
E0.1.6	0,9	1,28	1,57	1,62	1,64	1,44	1,47	1,81	1,4	1,95
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	1,9	t cal =	0,66	t cal =	0,32	t cal =	0,41	t cal =	1,21

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 6 semanas. Los números expresan medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.27), muestra que no hay diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la anchura de diáfisis (ADR), metáfisis (AMR), placa proximal (APP), Placa distal (APD), y epífisis (AEM) entre la articulación afectada y el control.

Ilustración 5.5.15: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.15) que representa las medidas promedio en anchura de ambas extremidades se observa que estas son mayores en la extremidad izquierda intervenida que en la extremidad control derecha. (porcentaje de error del 5 %).

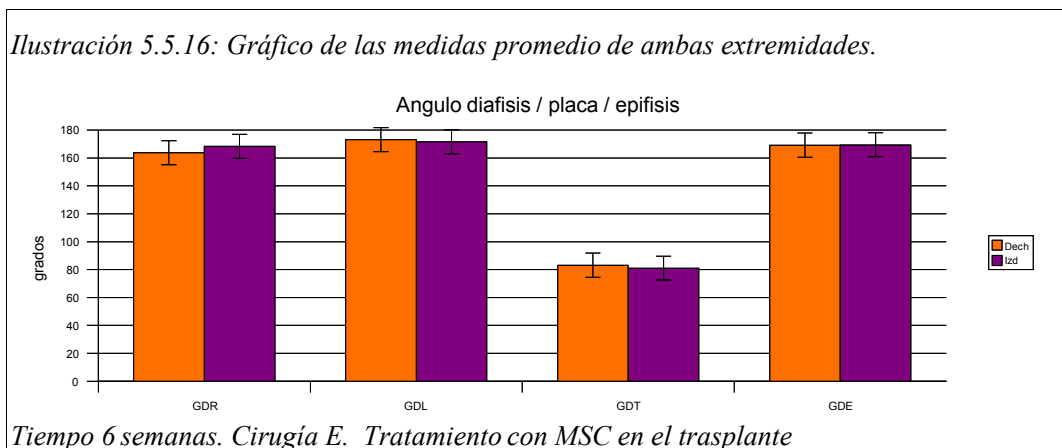
Tabla 5.5.28: Medidas comparativas de los ángulos de los ejes de la diáfisis, de esta con el eje de la placa longitudinal y transversal y con el eje longitudinal de la epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.1.1	165,4	162,5	172,3	171,0	79,5	69,3	170,6	166,6
E0.1.2	166,0	159,0	169,9	169,9	80,3	101,8	167,2	166,7
E0.1.3	159,1	172,2	172,0	173,7	86,8	97,6	169,1	175,9
E0.1.4	162,8	177,4	175,2	167,5	84,7	66,9	171,7	168,7
E0.1.5	165,1	163,2	177,6	177,0	85,1	73,5	173,1	172,2
E0.1.6	164,1	176,3	172,2	170,4	82,4	77,6	163,8	166,7
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 1,19		t cal = 1,23		t cal = 0,33		t cal = 0,12	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 6 semanas, medidas en grados.

En el análisis estadístico comparativo de los ángulos formados por diáfisis del radio, ejes de la placa y epífisis. (Tabla 5.5.28), muestra que no hay diferencias significativas en ninguno de los ángulos medidos entre ambas extremidades.

Resultados



En el gráfico (Ilustración 5.5.16) se indican las mediciones angulares promedio de ambas extremidades con un tiempo de 6 semanas, (porcentaje de error del 5 %). Las mediciones son similares en ambos casos. Se corrobora la imagen radiológica en la que no se observaron apenas desviaciones en la extremidad intervenida.

Grupo E0. Tiempo 12 semanas

Caso: E0.2.1. Radiológicamente se observa la placa de crecimiento al mismo nivel en ambos huesos, quizás la fisis radial este algo más distal que la fisis del cúbito, no hay grandes cambios óseos significativos (Fig 5.5.16). Se observa un ligero acortamiento del antebrazo, subluxación discreta radio-carpiana, irregularidad en la epífisis distal del radio. Hay irregularidades en las imágenes de radio-transparencia que se corresponden con la placa de crecimiento, en estas irregularidades se aprecia una imagen de aparente puente óseo central. Se observa un ensanchamiento de la metáfisis que se prolonga hasta el inicio de la región diafisaria del radio, discreto aumento de la curvatura del radio en el tercio medio proximal

Caso E0.2.2. Radiológicamente se observa una mano zamba con desviación radial, con un incurvamiento del cúbito, en el tercio distal producido por el radio. Hay un acortamiento de la extremidad, con anomalías en la articulación del codo. En la articulación radio-carpiana se observa discreta anomalía en la congruencia de la articulación radio-cubital con discreta diastasis en la articulación radio-cubital. Se observa discreta alteración en la epífisis distal del radio aunque mantiene la congruencia con la región carpiana. En la zona de la muñeca se observa que la fisis del cúbito es “plus”, con separación de la articulación radio-cubital, la epífisis distal del radio es más pequeña pero congruente con la región carpiana.

Subyacente a la epífisis se observa una gran imagen de radio-transparencia en la zona que debiera corresponder a la fisis, con algunos puntos radio-condensantes en zona proximal y periférica (Fig 5.5.17). Esta zona, radiológicamente translúcida, abarca unos 3x4 mm sobre la radiografía, las corticales de esta zona se encuentran insufladas con imágenes, en ambos lados, de pequeñas muescas, la cortical interna de esta área es más radio-condensante que la cortical externa que es más radio-translúcida.

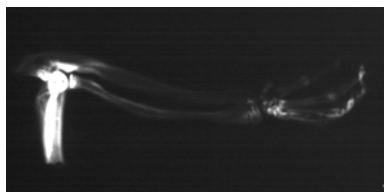


Fig 5.5.16.: Caso E0.2.1

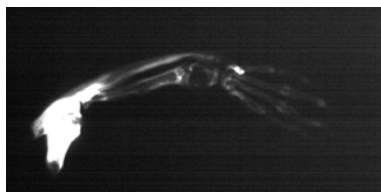


Fig 5.5.17.: Caso E0.2.2

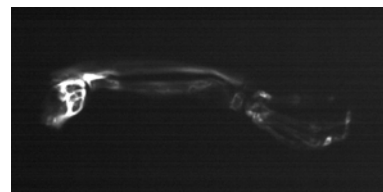


Fig 5.5.18.: Caso E0.2.3

Caso E0.2.3 Radiológicamente se observa una mano discretamente desviada, con un incurvamiento ligero del cúbito, en el tercio distal. Se aprecia un acortamiento de la extremidad superior en el radio intervenido. Se observa una cierta congruencia en la articulación radio-carpiana. La epífisis del radio conserva una estructura poligonal compatible con un patrón de normalidad. En la región fisis-metáfisaria se observa una imagen de radio-transparencia (Fig 5.5.18)

Subyacente a la epífisis, como en el caso anterior, se observa imagen de radio-transparencia de aproximadamente unos 3 x 3 mm, la imagen se acompaña con una insuflación de las corticales. La cortical interna es radio-condensante en el tercio medio, en el lado externo se pierde la imagen cortical, no se identifica aunque existe una pequeña banda a ambos lados radio-condensante muy tenue aumentando la imagen de radio-translúcida en la zona central. En la zona metafisaria, aunque no se aprecia bien, parece que hay una deflexión de la cortical interna de la metáfisis y una imagen discretamente en copa de la cortical externa de la metáfisis. Limitando la zona de radio-translúcida hay una zona radio-condensante que la separa parcialmente del resto del tejido medular de la diáfisis.

Caso E0.2.4 Radiológicamente se observa una fisis radial en posición “plus”, discretamente más alejada que la del cúbito. Se conserva la congruencia radio-carpiana. La epífisis del radio es normal. La metáfisis tiene un moderado ensanchamiento. Discreto acortamiento del antebrazo. Mano sin desviaciones. Las epífisis están al mismo nivel. (Fig 5.5.19). La fisis del cúbito se encuentra con una imagen radio-translúcida mientras que en la fisis del radio se pierde la imagen de translucidez, siendo sustituida por una imagen discreta de radio-opacidad no muy densa. Hay un discreto acortamiento en la zona central del radio y anomalías en la articulación del codo. Es sugerente la imagen de lesión del tercio medio superior de la diáfisis del radio, da la sensación de que el tercio superior del radio crece por la placa de crecimiento proximal mientras que los 2/3 distales crecen bajo la responsabilidad de la placa de crecimiento distal. (Fig 5.5.19)

Resultados

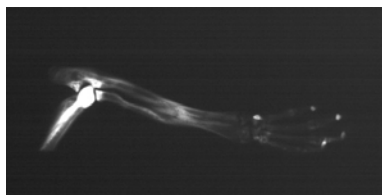


Fig 5.5.19.: Caso E0.2.4

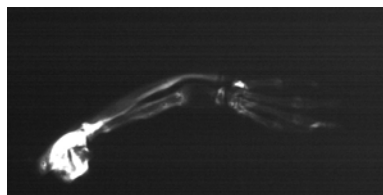


Fig 5.5.20.: Caso E0.2.5

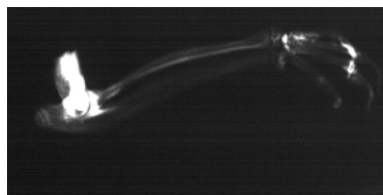


Fig 5.5.21.: Caso E0.2.5 control

Caso E0.2.5 Radiológicamente se observa una mano zamba con desviación radial. Encorvamiento del cúbito, en su tercio distal, producido por el radio. Epífisis al mismo nivel con patrones de normalidad. (Fig 5.5.20). Se observa un acortamiento de la extremidad. No existe alteración en la congruencia radio-carpiana. La epífisis del radio conserva su arquitectura normal, con cierta distorsión en la cara interna. Próxima a epífisis, en región fisis-metáfisis se observa una imagen de radio-transparencia de gran tamaño, aproximadamente 3,5x2,5 mm, sin puntos radio-condensantes. (Fig 5.5.20). No se identifica una estructura que recuerde a la cortical, hay imágenes de discreta radio-condensación en ambos márgenes que insuflan las corticales, esta imagen radio-translúcida se continua, sin solución de continuidad, como en los otros casos con la metáfisis. En la metáfisis no hay imagen en copa, si hay una imagen radio-condensante transversal que marca una perdida de la continuidad entre la imagen translúcida citada y la diáfisis. Hay irregularidades en la zona diafisaria, no hay incurvamiento del radio pero si hay alteración del ángulo del eje longitudinal correspondiente a la epífisis-placa y diáfisis. La cortical interna del radio sobresale y deja una impronta en el cúbito dando lugar a una inflexión del cúbito en dicha zona.

Tabla 5.5.29: Medidas de la articulación trasplantada.

	E0.2.1 lzd.	E0.2.2 lzd.	E0.2.3 lzd.	E0.2.4 lzd.	E0.2.5 lzd.	E0.2.6 lzd.	Media	Desvest
LC	28,38	25,25	23,29	27,46	25,13	25,20	25,79	1,83
LR	22,95	17,22	17,50	20,80	17,72	18,74	19,16	2,27
LPR	9,55	12,42	13,03	12,61	8,54	10,52	11,11	1,85
LDR	13,74	5,05	4,81	8,13	9,29	8,32	8,22	3,27
LPI	0,42	3,96	1,44	0,49	3,68	2,48	2,08	1,55
LPM	0,33	3,54	2,72	0,28	3,50	2,59	2,16	1,49
LPE	0,46	3,45	3,17	0,43	3,79	2,16	2,24	1,5
LEI	0,81	0,82	1,05	0,91	0,64	0,74	0,83	0,14
LEE	1,04	0,97	1,06	1,22	0,93	1,02	1,04	0,1
ADR	0,87	1,44	1,46	2,09	1,60	1,58	1,51	0,39
AMR	1,43	2,24	2,07	2,06	1,42	2,30	1,92	0,39
APP	1,62	2,66	2,01	2,07	2,39	2,14	2,15	0,35
APD	1,68	2,09	2,01	2,01	2,15	2,12	2,01	0,17
AEM	1,86	1,92	1,76	2,01	1,90	1,89	1,89	0,08
GDR	158,15	159,06	148,81	177,22	158,45	158,46	160,03	9,28
GDL	160,02	156,72	147,13	164,25	159,34	158,30	157,63	5,73
GDT	103,24	67,28	59,86	94,76	66,85	78,40	78,40	17,24
GDE	157,75	165,47	148,36	165,52	157,83	162,50	159,57	6,49

Casos de la serie E, con células MSC en el momento del trasplante y un tiempo de 12 semanas.

Tabla 5.5.30: Medidas de la articulación control.

	E0.2.1	E0.2.2	E0.2.3	E0.2.4	E0.2.5	E0.2.6		
	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Media	Desvest
LC	31,94	31,60	30,45	30,83	31,01	31,12	31,16	0,54
LR	24,80	23,93	24,50	24,01	24,46	24,26	24,33	0,33
LPR	10,13	8,44	9,82	10,82	11,68	10,20	10,18	1,08
LDR	14,84	15,74	14,81	13,43	13,07	14,28	14,36	0,99
LPI	0,28	0,48	0,41	0,51	0,39	0,42	0,42	0,08
LPM	0,44	0,30	0,38	0,55	0,50	0,44	0,44	0,09
LPE	0,39	0,30	0,27	0,55	0,43	0,39	0,39	0,1
LEI	0,62	0,58	0,65	0,64	0,61	0,61	0,62	0,02
LEE	1,00	1,01	1,09	0,96	1,01	1,00	1,01	0,04
ADR	1,13	0,95	1,10	1,06	1,14	1,08	1,08	0,07
AMR	1,68	1,28	1,31	1,54	1,68	1,52	1,50	0,17
APP	1,82	1,10	1,19	1,58	1,61	1,56	1,48	0,27
APD	1,65	1,08	1,16	1,73	1,54	1,43	1,43	0,26
AEM	1,85	0,97	1,43	1,59	1,65	1,48	1,50	0,3
GDR	164,97	161,22	165,28	162,00	162,85	164,28	163,43	1,66
GDL	177,93	179,02	174,23	173,29	171,23	173,26	174,83	3,01
GDT	85,95	85,79	89,29	83,22	81,23	83,66	84,86	2,79
GDE	178,46	170,25	171,53	171,95	171,13	170,20	172,25	3,12

Casos de la serie E, con células MSC en el momento del trasplante y un tiempo de 12 semanas.

Tabla 5.5.31: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades.

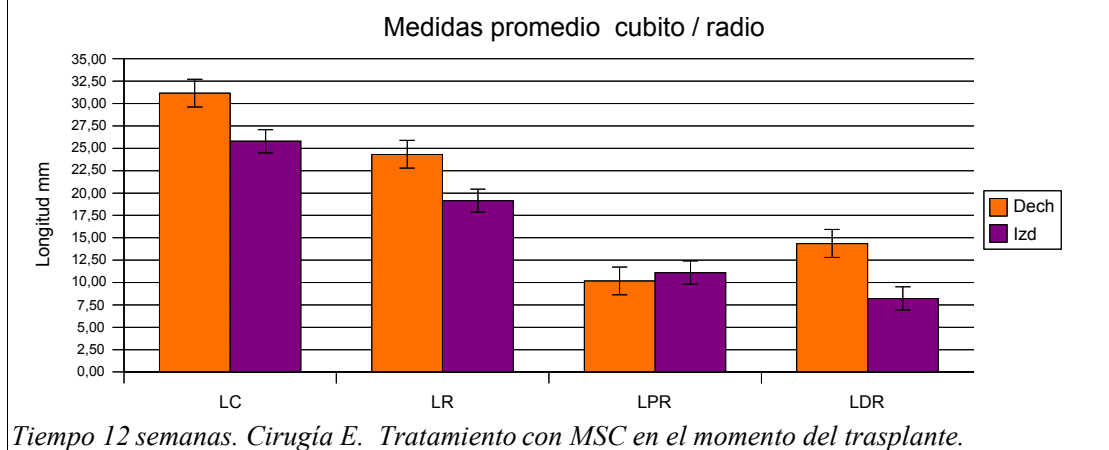
Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.2.1	31,94	28,38	24,80	22,95	10,13	9,55	14,84	13,74
E0.2.2	31,60	25,25	23,93	17,22	8,44	12,42	15,74	5,05
E0.2.3	30,45	23,29	24,50	17,50	9,82	13,03	14,81	4,81
E0.2.4	30,83	27,46	24,01	20,80	10,82	12,61	13,43	8,13
E0.2.5	31,01	25,13	24,46	17,72	11,68	8,54	13,07	9,29
E0.2.6	31,12	25,20	24,26	18,74	10,20	10,52	14,28	8,32
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 8,49		t cal = 5,88		t cal = 0,87		t cal = 4,1	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm.

En el análisis estadístico comparativo de las longitudes del cúbito (LC), radio (LR), eje proximal (LPR) y distal del radio (LDR), (Tabla 5.5.31), vemos que existen diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en las longitudes de radio, cúbito, y eje distal del radio entre la articulación intervenida y la articulación derecha control. No existen sin embargo diferencias significativas en la longitud del eje proximal del radio, zona controlada por la placa proximal del radio.

Resultados

Ilustración 5.5.17: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.17) se indican las medidas promedio de las longitudes de cúbito, radio, eje proximal del radio, y eje distal del radio para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). En el patrón estructural normal el eje distal del radio (LDR) es mayor que el eje proximal (LPR), esto sucede en la extremidad control (decha), en la extremidad intervenida esto está invertido y el eje proximal es más largo que el distal.

Tabla 5.5.32: Medidas comparativas de las longitudes de la placa interior, media y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.2.1	0,28	0,42	0,44	0,33	0,39	0,46
E0.2.2	0,48	3,96	0,30	3,54	0,30	3,45
E0.2.3	0,41	1,44	0,38	2,72	0,27	3,17
E0.2.4	0,51	0,49	0,55	0,28	0,55	0,43
E0.2.5	0,39	3,68	0,50	3,50	0,43	3,79
E0.2.6	0,42	2,48	0,44	2,59	0,39	2,16
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	2,67	t cal =	2,75	t cal =	2,92

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 12 semanas. Cirugía E. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la placa en la zona interior (LPI), media (LPM) y exterior (LPE) (Tabla 5.5.32), muestra diferencias significativas en las 3 zonas ($t_{cal} > t_{tab}$). Hay que destacar las medidas alcanzadas por la placa en los casos E0.2.2, E0.2.3, E0.2.5 y E0.2.6.

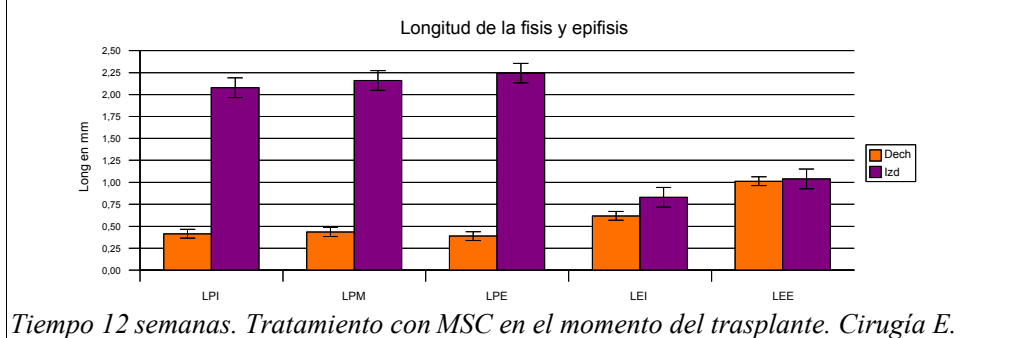
Tabla 5.5.33: Medidas comparativas de las longitudes de la epífisis interior y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long epífisis int LEI		Long epífisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.2.1	0,62	0,81	1,00	1,04
E0.2.2	0,58	0,82	1,01	0,97
E0.2.3	0,65	1,05	1,09	1,06
E0.2.4	0,64	0,91	0,96	1,22
E0.2.5	0,61	0,64	1,01	0,93
E0.2.6	0,61	0,74	1,00	1,02
	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	4,07	t cal =	0,57

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas en mm.

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.33) de las longitudes de la epífisis en la zona interior (LEI) y exterior (LEE) muestra diferencias significativas en la epífisis interior, contrariamente a los casos anteriores en que las diferencias estaban en la zona exterior.

Ilustración 5.5.18: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.18) se indican las medidas promedio de las longitudes de la fisis y epífisis para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). Los resultados muestran que tanto la fisis en todas las zonas (interior, media y exterior) como la epífisis son mayores en la mano intervenida.

El tratamiento con células MSC en esta serie de casos ha producido un crecimiento extraordinario en la fisis intervenida.

Resultados

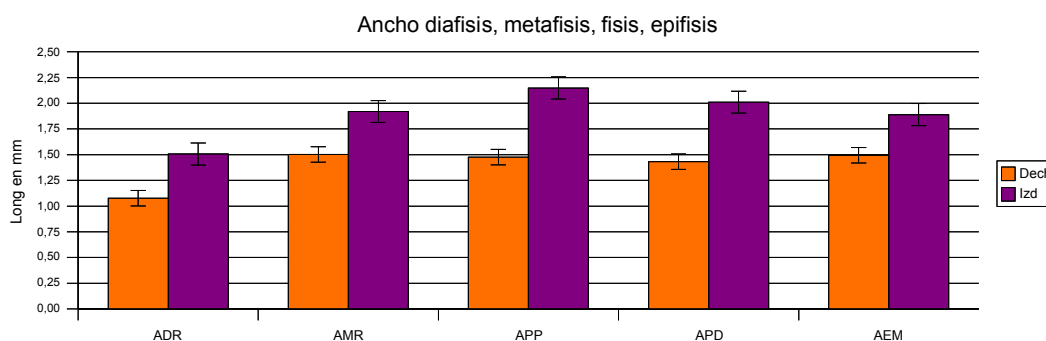
Tabla 5.5.34: Medidas comparativas en anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMR		A placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.2.1	1,13	0,87	1,68	1,43	1,82	1,62	1,65	1,68	1,85	1,86
E0.2.2	0,95	1,44	1,28	2,24	1,10	2,66	1,08	2,09	0,97	1,92
E0.2.3	1,10	1,46	1,31	2,07	1,19	2,01	1,16	2,01	1,43	1,76
E0.2.4	1,06	2,09	1,54	2,06	1,58	2,07	1,73	2,01	1,59	2,01
E0.2.5	1,14	1,60	1,68	1,42	1,61	2,39	1,54	2,15	1,65	1,90
E0.2.6	1,08	1,58	1,52	2,3	1,56	2,14	1,43	2,12	1,48	1,89
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 2,55		t cal = 1,90		t cal = 2,89		t cal = 3,89		t cal = 3,12	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Cirugía E. Tiempo 12 semanas. Medidas en mm.

En el análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.34) de la anchura de la diáfisis (ADR), metáfisis (AMR), epífisis (AEM) y fisis proximal (APP) y distal (APD) muestra que no hay diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la anchura de la diáfisis y metáfisis, pero si en la epífisis y placa.

Ilustración 5.5.19: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Tiempo 12 semanas. Tratamiento con MSC en el momento del trasplante. Cirugía E

En el gráfico (Ilustración 5.5.19) el diagrama de barras de las medidas promedio de las anchuras (porcentaje de error del 5 %), muestra que la anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis, es mayor en todos los casos en la extremidad intervenida que en el control.

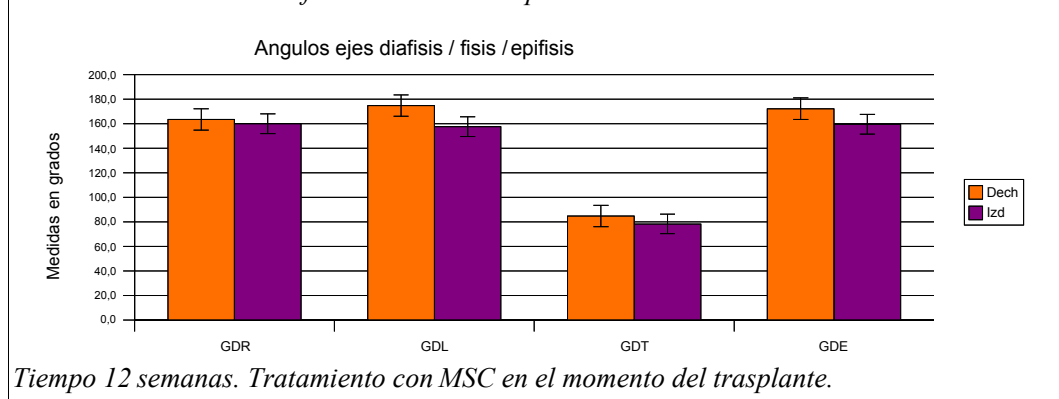
Tabla 5.5.35: Medidas comparativas de los ángulos de la diáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.2.1	165,0	158,2	177,9	160,0	86,0	103,2	178,5	157,8
E0.2.2	161,2	159,1	179,0	156,7	85,8	67,3	170,3	165,5
E0.2.3	165,3	148,8	174,2	147,1	89,3	59,9	171,5	148,4
E0.2.4	162,0	177,2	173,3	164,2	83,2	94,8	172,0	165,5
E0.2.5	162,9	158,4	171,2	159,3	81,2	66,9	171,1	157,8
E0.2.6	164,3	158,5	173,3	158,3	83,7	78,4	170,2	162,5
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 0,80		t cal = 6,29		t cal = 0,88		t cal = 4,00	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas en grados.

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.35) de los ángulos formados por diáfisis del radio, ejes de la placa y epífisis, muestra que hay diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en el ángulo diáfisis/eje longitudinal de la placa y diáfisis/eje longitudinal de la epífisis, lo que corrobora la observación radiológica, de incurvamiento radial de la mano.

Ilustración 5.5.20: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.20) el diagrama de barras de las medias angulares (porcentaje de error del 5 %), muestra que hay diferencias en el ángulo diáfisis/eje longitudinal de la placa (GDL) y diáfisis/eje longitudinal de la epífisis (GDE).

Grupo E0. Tiempo 24 semanas

Caso E0.3.1 Radiológicamente se observa un acortamiento de la extremidad. No hay desviación de la mano. Se observa una fisis muy “minus” con respecto al cúbito y una epífisis ha crecido anormalmente compensando el déficit del crecimiento radial. Hay un ensanchamiento de la metáfisis, que produce una impronta en el cúbito y también se observa alteración y ensanchamiento a nivel del tercio inferior de la diáfisis (Fig 5.5.22)

Caso E0.3.2 Se observa desviación discreta de la mano, “mano zamba”, y separación en la articulación, en zona distal entre el cúbito y el radio. La epífisis del radio tienen una imagen muy condensante, la imagen muestra continuidad entre la epífisis y la zona metafisis-diafisaria. En zona metafisaria se alternan zonas radio-condensantes con zonas transparentes que se podría interpretar como una zona de osificación en esa área. En zona fiso-metaphisaria se observa una zona transparente correspondiente a cartílago. (Fig. 5.5.23). Por la edad del animal las placas ya están cerradas pero la imagen sugiere que el injerto de placa ha funcionado y ha permitido un crecimiento de la mano sin grandes desviaciones.

Caso E0.3.3 Se observa incurvamiento en el cúbito con alteración de la cortical del cúbito próxima al radio, se observa una mano zamba radial. En el radio la epífisis tienen una imagen muy radio-condensante, la zona fiso-metaphisaria se alternan zonas radio-lúcidas con zonas radio-transparentes muy irregulares. Hay una disociación entre el cúbito y radio en los ensanchamientos de ambos a nivel de la metáfisis e incluso de la diáfisis y separación en la zona distal entre el cúbito y el radio. En la zona proximal de la diáfisis del radio las corticales son normales pero en el tercio medio distal las corticales están alteradas. (Fig 5.5.24)

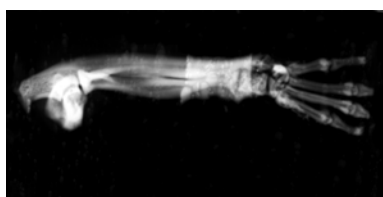


Fig 5.5.22.: Caso E0.3.1



Fig 5.5.23.: Caso E0.3.2

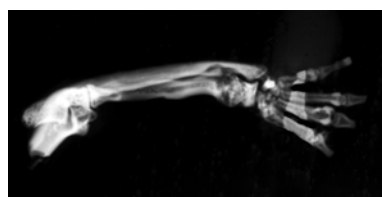


Fig 5.5.24.: Caso E0.3.3

Caso E0.3.4 Se observa acortamiento de la extremidad pero sin producir desviación en la mano, fisis muy “minus” con respecto al cúbito, la epífisis ha crecido anormalmente compensando el déficit del crecimiento radial. En zona fiso-epifisaria se alternan zonas radio-lúcidas con zonas radio-transparentes. Se observa una separación en la articulación, en zona distal entre el cúbito y el radio y una disociación, como en el caso anterior entre el cúbito y radio en los ensanchamientos de ambos a nivel de la metáfisis (Fig 5.5.25)

Caso E0.3.5 Se observa incurvamiento en el cúbito con alteración de la cortical del cúbito próxima al radio, se observa una mano zamba radial. En el radio, la epífisis tiene una

imagen muy radio-condensante y ha crecido anormalmente. La zona fiso-metafisaria esta alterada con ensanchamientos a ambos niveles y muestra una imagen muy radio-condensante. Se observa una alteración entre la metáfisis y diáfisis marcada por una discontinuidad y un crecimiento anormal con alteración de las corticales diafisarias. (Fig 5.5.26)

Caso E0.3.6 Se observa incurvamiento del cúbito con alteración de la cortical próxima al radio produciendo mano zamba radial. La epífisis del radio se observa de mayor tamaño que en el control con engrosamiento radiológico de sus corticales y de las trabéculas óseas. La fisis es “minus”, pero la zona articular de la epífisis conserva la congruencia articular. La zona fiso-metafisaria con ensanchamientos a ambos niveles donde se alternan zonas radio-lúcidas con zonas radio-transparentes irregulares. Se observa una discontinuidad en la zona meta-diafisaria, alternando zonas transparentes que se podrían corresponder con formación cartilaginosa, con pequeños filamentos a modo de flecos de zonas opacas que sugieren puentes óseos. (Fig 5.5.27)

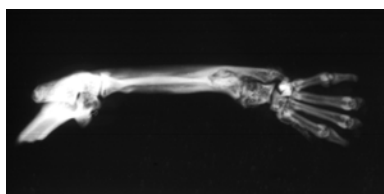


Fig 5.5.25.: Caso E0.3.4

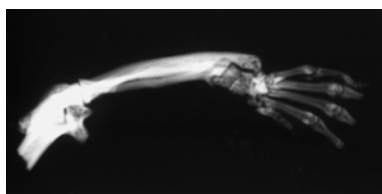


Fig 5.5.26.: Caso E0.3.5



Fig 5.5.27.: Caso E0.3.6

Tabla 5.5.36: Medidas de la articulación trasplantada.

	E0.3.1 lzd.	E0.3.2 lzd.	E0.3.3 lzd.	E0.3.4 lzd.	E0.3.5 lzd.	E0.3.6 lzd.	Media	Desvest
LC	28,01	28,62	26,26	27,92	25,89	29,25	27,66	1,32
LR	21,85	19,62	17,42	19,21	17,80	20,47	19,39	1,66
LPR	9,35	9,33	9,52	9,56	10,91	13,29	10,33	1,57
LDR	12,33	10,92	8,11	9,55	7,04	7,35	9,22	2,10
LPI	0,23	0,06	0,20	0,08	0,08	0,18	0,14	0,07
LPM	0,30	0,10	0,06	0,08	0,13	0,17	0,14	0,09
LPE	0,13	0,16	0,33	0,27	0,19	0,13	0,20	0,08
LEI	2,86	0,68	1,34	3,33	1,20	1,37	1,80	1,05
LEE	3,15	1,11	0,96	3,17	1,96	1,62	2,00	0,97
ADR	1,77	1,36	1,66	1,61	1,72	1,70	1,64	0,15
AMR	2,55	1,88	2,82	1,91	2,38	2,50	2,34	0,37
APP	2,99	1,89	2,17	2,12	2,11	2,29	2,26	0,38
APD	3,12	1,79	1,96	2,10	2,20	2,20	2,22	0,46
AEM	2,20	1,70	2,34	2,39	2,21	2,00	2,14	0,25
GDR	173,50	157,32	170,60	169,86	153,17	156,74	163,53	8,74
GDL	167,66	178,00	167,05	168,10	159,16	167,90	167,98	5,99
GDT	81,65	89,02	84,87	84,76	57,96	78,26	79,42	11,11
GDE	176,15	176,04	169,62	175,57	161,62	177,17	172,70	6,06

Casos de la serie E, con células MSC en el momento del trasplante y un tiempo de 24 semanas.

Resultados

Tabla 5.5.37: Medidas de la articulación control.

	E0.3.1	E0.3.2	E0.3.3	E0.3.4	E0.3.5	E0.3.6		
	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Media	Desvest
LC		28,86	32,45		32,26	30,08	30,91	1,74
LR		25,24	25,55		25,72	25,39	25,47	0,21
LPR		10,51	9,31		10,94	10,27	10,26	0,69
LDR	16,89	14,82	16,22	14,09	14,99	15,34	15,39	1,01
LPI	0,13	0,17	0,13	0,12	0,06	0,04	0,11	0,05
LPM	0,16	0,10	0,06	0,11	0,05	0,09	0,10	0,04
LPE	0,26	0,07	0,10	0,06	0,08	0,13	0,12	0,08
LEI	0,86	0,75	0,73	0,73	0,72	0,64	0,74	0,07
LEE	1,15	1,23	1,00	1,26	1,14	1,07	1,14	0,1
ADR	1,05	0,97	1,02	0,88	1,05	0,94	0,98	0,07
AMR	1,68	1,74	1,50	1,66	1,89	1,83	1,72	0,14
APP	1,71	1,78	1,69	1,77	1,81	1,88	1,77	0,07
APD	1,73	1,96	1,79	1,95	1,83	1,96	1,87	0,1
AEM	1,92	1,91	1,94	1,97	1,79	1,76	1,88	0,09
GDR	168,83	166,14	170,10	170,72	162,56	162,63	166,83	3,64
GDL	176,19	167,87	173,78	178,58	178,87	171,57	174,47	4,28
GDT	85,77	76,59	83,39	94,17	87,13	89,97	86,17	5,98
GDE	165,84	161,19	165,89	168,21	174,07	160,42	165,94	4,99

Casos de la serie E, con células MSC en el momento del trasplante y un tiempo de 24 semanas.

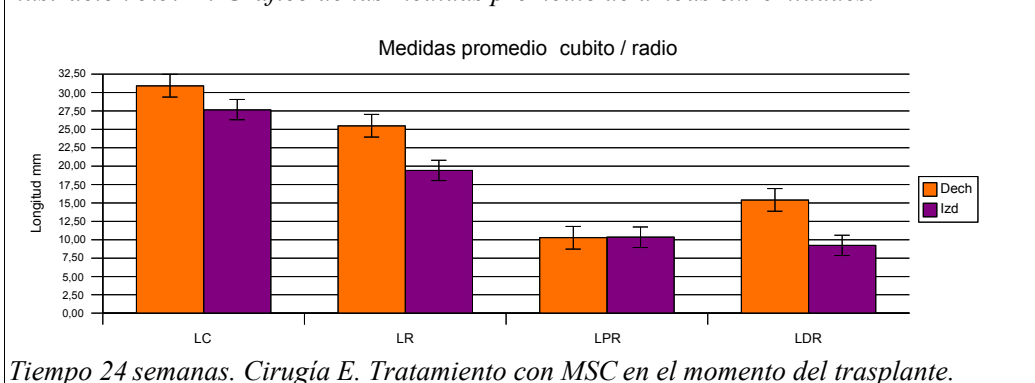
Tabla 5.5.38: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades.

Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	lzd	Dech	lzd	Dech	lzd	Dech	lzd
E0.3.1		28,01		21,85		9,35	16,89	12,33
E0.3.2	28,86	28,62	25,24	19,62	10,51	9,33	14,82	10,92
E0.3.3	32,45	26,26	25,55	17,42	9,31	9,52	16,22	8,11
E0.3.4		27,92		19,21		9,56	14,09	9,55
E0.3.5	32,26	25,89	25,72	17,80	10,94	10,91	14,99	7,04
E0.3.6	30,08	29,25	25,39	20,47	10,27	13,29	15,34	7,35
	t tab =	3,18	t tab =	3,18	t tab =	3,18	t tab =	2,57
	t cal =	0,97	t cal =	0,40	t cal =	1,56	t cal =	7,45

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Cirugía E. Tiempo 24 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio (Tabla 5.5.38), nos muestra, contrariamente a lo que podría ser presumible, para este tiempo de valoración de 24 semanas, que no existen diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en las longitudes de radio, cúbito, y eje proximal del radio entre la articulación intervenida y la articulación derecha control. Sí existen sin embargo diferencias significativas en la longitud del eje distal del radio.

Ilustración 5.5.21: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.21) se indican las medidas promedio de las longitudes de cúbito y radio para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). En el patrón normal el eje distal del radio (LDR) es mayor que el eje proximal (LPR), en la extremidad trasplantada esto está invertido y el eje proximal es más largo que el distal.

Tabla 5.5.39: Medidas comparativas de las longitudes de la placa de ambas extremidades

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.3.1	0,13	0,23	0,16	0,3	0,26	0,13
E0.3.2	0,17	0,06	0,10	0,1	0,07	0,16
E0.3.3	0,13	0,2	0,06	0,06	0,10	0,33
E0.3.4	0,12	0,08	0,11	0,08	0,06	0,27
E0.3.5	0,06	0,08	0,05	0,13	0,08	0,19
E0.3.6	0,04	0,18	0,09	0,17	0,13	0,13
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	0,75	t cal =	1,66	t cal =	1,53

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 24 semanas. Medidas reales en mm. Cirugía E

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la placa radial distal, en la zona interior, media y exterior (Tabla 5.5.39), nos muestra que no existen diferencias significativas en las longitudes de la placa entre ambas articulaciones.

Tabla 5.5.40: Medidas comparativas de las longitudes de la epífisis de ambas extremidades

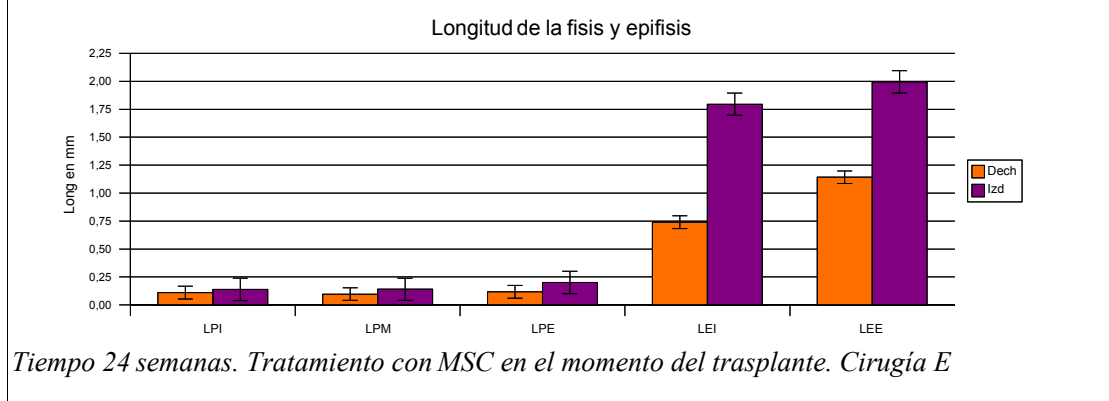
Casos	Long epifisis int LEI		Long epifisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.3.1	0,86	2,86	1,15	3,15
E0.3.2	0,75	0,68	1,23	1,11
E0.3.3	0,73	1,34	1,00	0,96
E0.3.4	0,73	3,33	1,26	3,17
E0.3.5	0,72	1,20	1,14	1,96
E0.3.6	0,64	1,37	1,07	1,62
	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	2,55	t cal =	2,26

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 24 semanas. Medidas en mm. Cirugía E

Resultados

El análisis comparativo de las longitudes de la epífisis, en la zona interior (LEI) y exterior (LEE), (Tabla 5.5.40), muestra que no existen diferencias significativas en las longitudes de la epífisis entre ambas articulaciones. Aquí también llama la atención las longitudes de la epífisis en los casos E0.3.1 y E0.3.4. que alcanzan una longitud que triplica el control.

Ilustración 5.5.22: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.22) se indican las medidas promedio de las longitudes de fisis y epífisis para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). Llama la atención la diferencia de crecimiento mostrada por la epífisis en la extremidad intervenida.

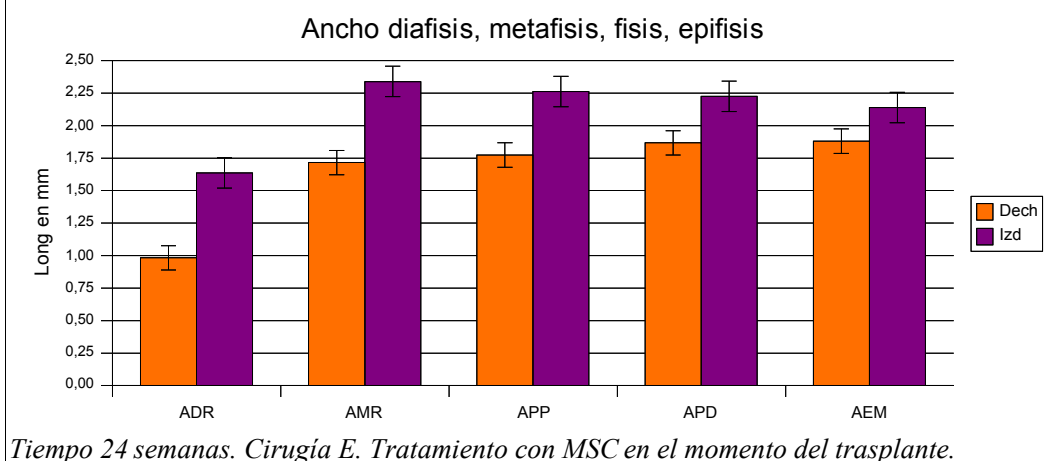
Tabla 5.5.41: Medidas comparativas del ancho de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades

Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMR		A placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.3.1	1,05	1,77	1,68	2,55	1,71	2,99	1,73	3,12	1,92	2,20
E0.3.2	0,97	1,36	1,74	1,88	1,78	1,89	1,96	1,79	1,91	1,70
E0.3.3	1,02	1,66	1,50	2,82	1,69	2,17	1,79	1,96	1,94	2,34
E0.3.4	0,88	1,61	1,66	1,91	1,77	2,12	1,95	2,10	1,97	2,39
E0.3.5	1,05	1,72	1,89	2,38	1,81	2,11	1,83	2,20	1,79	2,21
E0.3.6	0,94	1,70	1,83	2,50	1,88	2,29	1,96	2,20	1,76	2,00
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 11,78		t cal = 3,51		t cal = 2,91		t cal = 1,63		t cal = 2,62	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Tiempo 24 semanas. Cirugía E. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de las anchuras de los huesos implicados en la articulación (Tabla 5.5.41), nos muestra que existen diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en las anchuras de la diáfisis (ADR), metáfisis (AMR), placa proximal (APP) y epífisis (AEM), entre ambas articulaciones.

Ilustración 5.5.23: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.23) se indican las medidas promedio del ancho de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). En todas las medidas la anchura es mayor en la extremidad intervenida. Esta mayor anchura en la extremidad intervenida es una constante que se ha mostrado en todos los casos estudiados.

Tabla 5.5.42: Medidas comparativas de los ángulos de los ejes de la diáfisis /placa /epífisis de ambas extremidades.

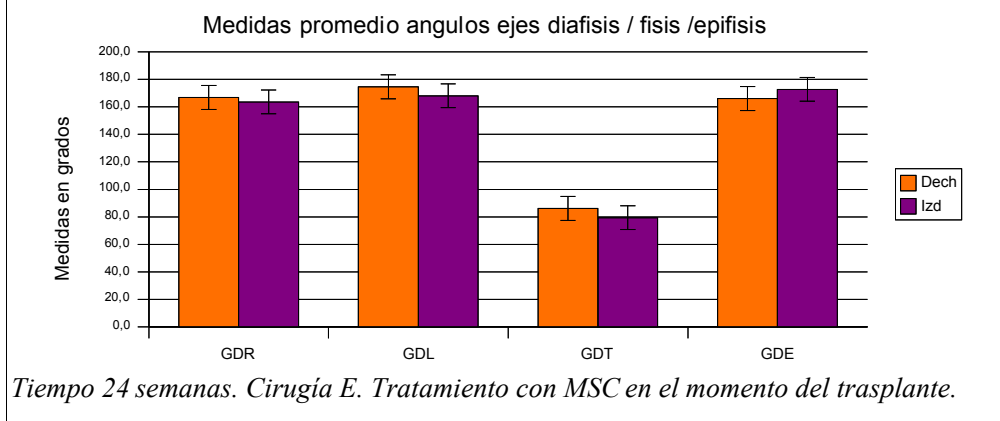
Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E0.3.1	168,8	173,5	176,2	167,7	85,8	81,6	165,8	176,1
E0.3.2	166,1	157,3	167,9	178,0	76,6	89,0	161,2	176,0
E0.3.3	170,1	170,6	173,8	167,1	83,4	84,9	165,9	169,6
E0.3.4	170,7	169,9	178,6	168,1	94,2	84,8	168,2	175,6
E0.3.5	162,6	153,2	178,9	159,2	87,1	58,0	174,1	161,6
E0.3.6	162,6	156,7	171,6	167,9	90,0	78,3	160,4	177,2
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 1,44		t cal = 1,63		t cal = 1,18		t cal = 1,57	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC en el trasplante. Cirugía E. Tiempo 24 semanas. Medidas en grados

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.42) de los ángulos formados por el eje de la diáfisis del radio y ejes de la placa y epífisis, muestra que no hay diferencias significativas en ninguno de los casos, lo que corrobora la valoración radiológica cualitativa en la que se mostraban, solo en algunos de los casos, discretas desviaciones radiales.

Resultados

Ilustración 5.5.24: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.24) se indican las medidas promedio de los ángulos de los ejes diáfisis / fisis / epífisis para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). Las diferencias en los ángulos no son muy acusadas

5.5.3 Serie E15. Con células MSC

Esta serie se corresponde con animales a los que se les realizó el trasplante de la fisis radial sola, se injertó la placa con su anillo pericondral sin ningún resto de hueso metafisario y recibieron tratamiento sistémico con células MSC a los 15 días de realizado el trasplante. Las valoraciones se han realizado a los tres tiempos marcados de 6, 12 y 24 semanas post-intervención.

Serie E15. Tiempo 6 semanas

Caso: E15.1.1 Radiológicamente no se aprecia desviación radial ni cubital de la mano, se aprecia una imagen de fisis radial discretamente “minus”, con respecto al cúbito, con un ligero ensanchamiento metafisario. Sin alteraciones óseas significativas (Fig 5.5.28)

Caso: E15.1.2 Radiológicamente en este caso tampoco se aprecia desviación radial ni cubital de la mano. La fisis del radio se encuentra en posición “minus” con respecto a la fisis cubital. Hay una zona irregular en la zona epifisaria radial, con un ensanchamiento en esta

zona. La zona radio-transparente que correspondería a la placa es irregular.(Fig 5.5.29)

Caso: E15.1.3 Radiológicamente en este caso no se aprecia tampoco desviación radial ni cubital de la mano. La zona radio-transparente que correspondería a la placa esta muy aumentada, y ocupa parte de la epífisis que radiológicamente se observa alterada, se muestra como una zona muy radio-translúcida. A nivel fisis-metáfisis se observa un ensanchamiento con un borde radio-condensante que dibuja una formación terminal en copa. (Fig 5.5.30)

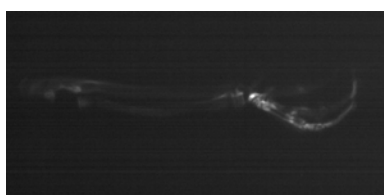


Fig 5.5.28. Caso E15.1.1

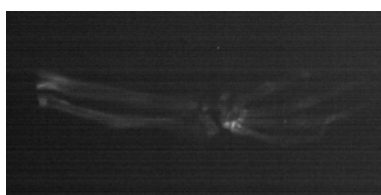


Fig 5.5.29. Caso E15.1.2

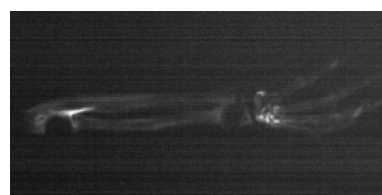


Fig 5.5.30. Caso E15.1.3

Caso: E15.1.4 Radiológicamente se observa que en este caso la desviación de la mano es cubital, mano zamba cubital. Fisis de radio en posición “plus”, adelantada con respecto a la fisis cubital. La zona radio-transparente que correspondería a la placa esta muy aumentada, y se observa un notable ensanchamiento de la zona fiso-metafisaria. (fig 5.5.31)

Caso: E15.1.5 Radiológicamente en este caso no se aprecia desviación radial ni cubital de la mano. Contrariamente a los casos anteriores apenas se observa la zona que correspondería a la placa, se aprecia una discreta imagen de radio-transparencia y un ligero ensanchamiento epifisario. Sin alteraciones óseas significativas (Fig 5.5.32)

Caso: E15.1.6 Radiológicamente en este caso se aprecia una ligera desviación radial. La zona radio-transparente que dibuja la placa se observa con una mayor anchura en la parte interior. La imagen es la de un patrón de normalidad sin alteraciones óseas significativas (Fig 5.5.33)

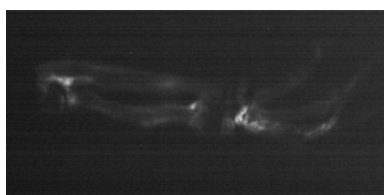


Fig 5.5.31. Caso E15.1.4

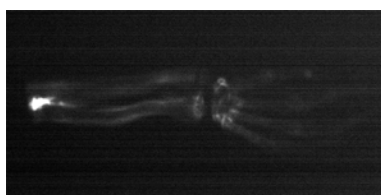


Fig 5.5.32. Caso E15.1.5

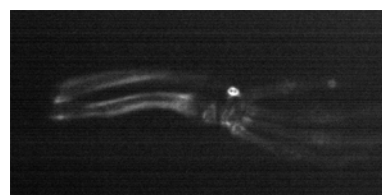


Fig 5.5.33. Caso E15.1.6

Resultados

Tabla 5.5.43: Medidas de la articulación trasplantada.

	E15.1.1	E15.1.2	E15.1.3	E15.1.4	E15.1.5	E15.1.6		
	lzd.	lzd.	lzd.	lzd.	lzd.	lzd.	Media	Desvest
LC	25,46	24,33	24,21	23,68	23,78		24,29	0,71
LR	18,61	18,12	18,37	16,65	17,23		17,80	0,83
LPR	8,55	8,41	8,46	7,59	8,68		8,34	0,43
LDR	10,14	9,52	9,83	8,85	8,50	6,01	8,81	1,50
LPI	0,31	0,47	1,80	1,66	0,19	1,05	0,91	0,7
LPM	0,41	0,40	2,20	1,80	0,21	0,58	0,93	0,84
LPE	0,24	0,42	1,03	1,63	0,39	0,50	0,70	0,53
LEI	1,06	0,75	0,62	0,79	0,60	0,69	0,75	0,17
LEE	1,26	1,05	1,22	1,24	0,82	1,12	1,12	0,17
ADR	0,89	1,19	1,08	1,35	1,15	1,04	1,12	0,15
AMR	1,93	1,66	1,71	1,78	1,31	1,47	1,64	0,22
APP	1,97	1,68	2,05	2,00	1,39	1,48	1,76	0,29
APD	1,91	1,83	2,16	2,11	1,45	1,41	1,81	0,32
AEM	1,72	1,88	2,08	2,17	1,73	1,48	1,84	0,25
GDR	164,88	162,86	174,87	166,59	170,67	163,61	167,25	4,65
GDL	173,17	151,71	172,46	179,42	175,84	169,09	170,28	9,74
GDT	93,37	124,61	78,67	79,26	84,61	75,57	89,35	18,37
GDE	175,24	156,77	173,38	176,60	174,61	176,25	172,14	7,62

Casos de la serie E, con células MSC a los 15 días del trasplante y un tiempo de 6 semanas.

Tabla 5.5.44: Medidas de la articulación control

	E15.1.1	E15.1.2	E15.1.3	E15.1.4	E15.1.5	E15.1.6		
	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Media	Desvest
LC	25,27	26,43	24,30	25,06		27,54	25,72	1,27
LR	20,88	21,61	21,04	21,26		21,83	21,32	0,39
LPR	8,63	9,35	9,24	8,52		10,14	9,18	0,65
LDR	12,51	12,50	12,04	12,72	13,05	11,80	12,44	0,45
LPI	0,38	0,51	0,34	0,46	0,39	0,36	0,41	0,07
LPM	0,30	0,42	0,40	0,40	0,45	0,34	0,39	0,06
LPE	0,45	0,58	0,37	0,51	0,42	0,37	0,45	0,08
LEI	0,76	0,74	0,53	0,74	0,73	0,73	0,71	0,09
LEE	1,01	1,07	0,84	1,12	0,98	1,26	1,05	0,14
ADR	1,12	0,90	0,87	0,96	0,91	0,90	0,94	0,09
AMR	1,55	1,38	1,21	1,49	1,18	1,32	1,36	0,15
APP	1,63	1,60	1,08	1,64	1,09	1,35	1,40	0,27
APD	1,66	1,73	1,08	1,58	1,04	1,49	1,43	0,3
AEM	1,42	1,85	1,23	1,72	1,16	1,59	1,50	0,27
GDR	163,94	163,00	165,32	165,99	163,12	167,61	164,83	1,81
GDL	174,58	175,98	179,83	178,89	173,45	174,96	176,28	2,54
GDT	83,58	79,76	87,21	86,76	80,39	85,00	83,78	3,16
GDE	168,87	175,84	176,31	170,42	173,18	175,00	173,27	3,05

Casos de la serie E, con células MSC a los 15 días del trasplante y un tiempo de 6 semanas.

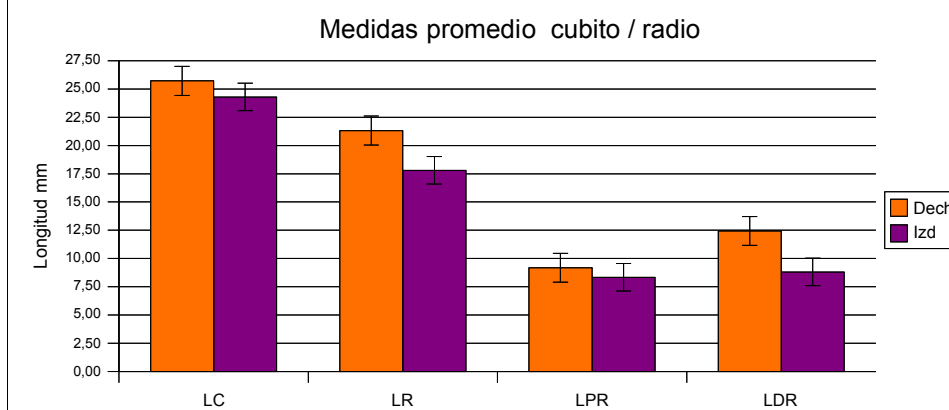
Tabla 5.5.45: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades.

Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.1.1	25,27	25,46	20,88	18,61	8,63	8,55	12,51	10,14
E15.1.2	26,43	24,33	21,61	18,12	9,35	8,41	12,50	9,52
E15.1.3	24,30	24,21	21,04	18,37	9,24	8,46	12,04	9,83
E15.1.4	25,06	23,68	21,26	16,65	8,52	7,59	12,72	8,85
E15.1.5		23,78		17,23		8,68	13,05	8,50
E15.1.6	27,54		21,83		10,14		11,80	6,01
	t tab =	2,78	t tab =	2,78	t tab =	2,78	t tab =	2,57
	t cal =	0,18	t cal =	0,57	t cal =	0,28	t cal =	6,42

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Cirugía E. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.45) de las longitudes del cúbito (LC), radio (LR), eje proximal (LPR) y distal del radio (LDR) muestra diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la longitud del eje distal del radio entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Ilustración 5.5.25: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Tiempo 6 semanas. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante.

En el gráfico de la ilustración 5.5.25, se indican las medidas promedio de ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). Las longitudes de cúbito, radio y eje proximal y distal del radio son mayores en la extremidad control, que en la intervenida. La diferencia es mas acusada en el caso del eje distal del radio, corroborando la diferencia significativa resultante para este parámetro.

Resultados

Tabla 5.5.46: Medidas de las longitudes de la placa, interior, media y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.1.1	0,38	0,31	0,3	0,41	0,45	0,24
E15.1.2	0,51	0,47	0,42	0,40	0,58	0,42
E15.1.3	0,34	1,80	0,40	2,2	0,37	1,03
E15.1.4	0,46	1,66	0,40	1,80	0,51	1,63
E15.1.5	0,39	0,19	0,45	0,21	0,42	0,39
E15.1.6	0,36	1,05	0,34	0,58	0,37	0,50
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	1,74	t cal =	1,60	t cal =	1,17

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Cirugía E. Tiempo 6 semanas. Medidas en mm.

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la placa en las tres secciones medidas, (Tabla 5.5.46) no muestra diferencias significativas en la longitud de la placa entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

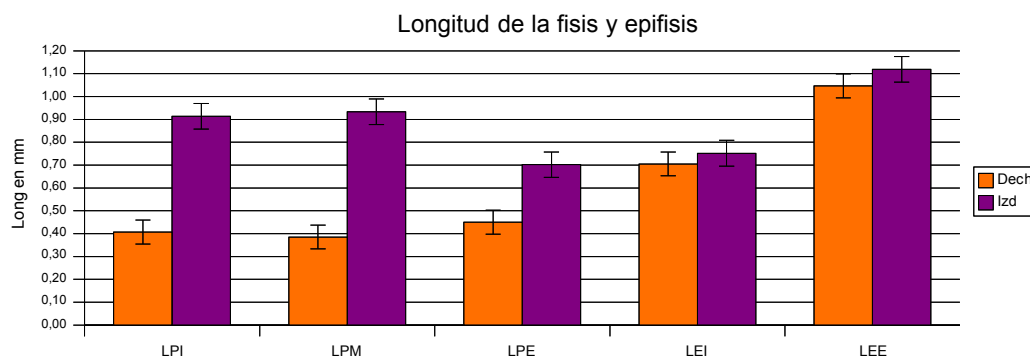
Tabla 5.5.47: Medidas de las longitudes de epífisis interior y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long epífisis int LEI		Long epífisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.1.1	0,76	1,06	1,01	1,26
E15.1.2	0,74	0,75	1,07	1,05
E15.1.3	0,53	0,62	0,84	1,22
E15.1.4	0,74	0,79	1,12	1,24
E15.1.5	0,73	0,60	0,98	0,82
E15.1.6	0,73	0,69	1,26	1,12
	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	0,78	t cal =	0,81

Análisis estadístico prueba t de Student. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 6 semanas. Cirugía E. Medidas en mm.

El análisis estadístico comparativo de la longitud de la epífisis en la zona interior (LEI) y exterior (LEE), (Tabla 5.5.47) no muestra diferencias significativas entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Ilustración 5.5.26: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Tiempo 6 semanas. Cirugía E. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante.

En el gráfico de la ilustración 5.5.26, se indican las medidas promedio de la fisis y epífisis de ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). Todos los parámetros de longitud medidos son mayores en la extremidad intervenida que en la extremidad control. La diferencia promedio es más acusada en la placa interior y media, aunque no sea significativa estadísticamente debido a la disparidad de los casos.

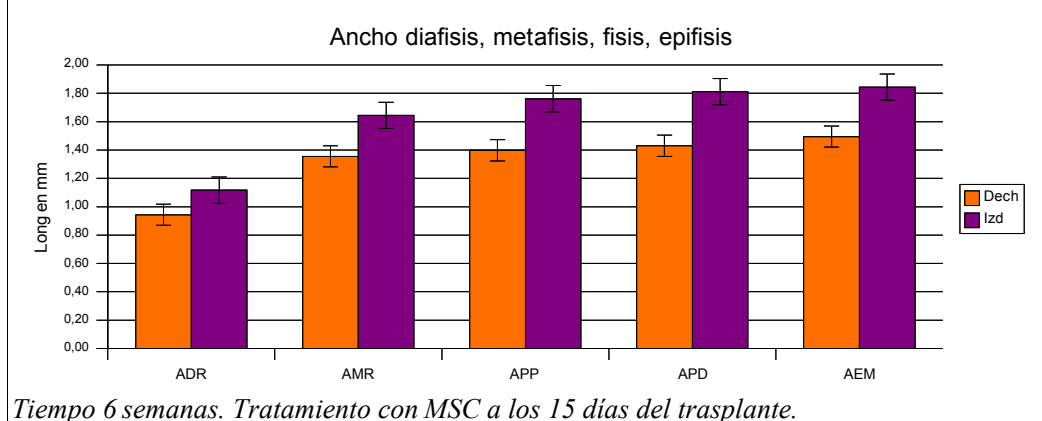
Tabla 5.5.48: Medidas comparativas de la anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMR		A placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.1.1	1,12	0,89	1,55	1,93	1,63	1,97	1,66	1,91	1,42	1,72
E15.1.2	0,90	1,19	1,38	1,66	1,60	1,68	1,73	1,83	1,85	1,88
E15.1.3	0,87	1,08	1,21	1,71	1,08	2,05	1,08	2,16	1,23	2,08
E15.1.4	0,96	1,35	1,49	1,78	1,64	2,00	1,58	2,11	1,72	2,17
E15.1.5	0,91	1,15	1,18	1,31	1,09	1,39	1,04	1,45	1,16	1,73
E15.1.6	0,9	1,04	1,32	1,47	1,35	1,48	1,49	1,41	1,59	1,48
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	1,98	t cal =	5,06	t cal =	2,79	t cal =	2,31	t cal =	2,41

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Cirugía E. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de los parámetros de anchura medidos, (Tabla 5.5.48) muestra diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la anchura de la metáfisis (AMR) y placa proximal (APP) entre la extremidad izquierda intervenida y extremidad derecha control.

Ilustración 5.5.27: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico de la ilustración 5.5.27, se indican las medidas promedio de la anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis (porcentaje de error del 5 %). El promedio de todas las medidas indicadas es mayor en la extremidad intervenida que en la extremidad control.

Resultados

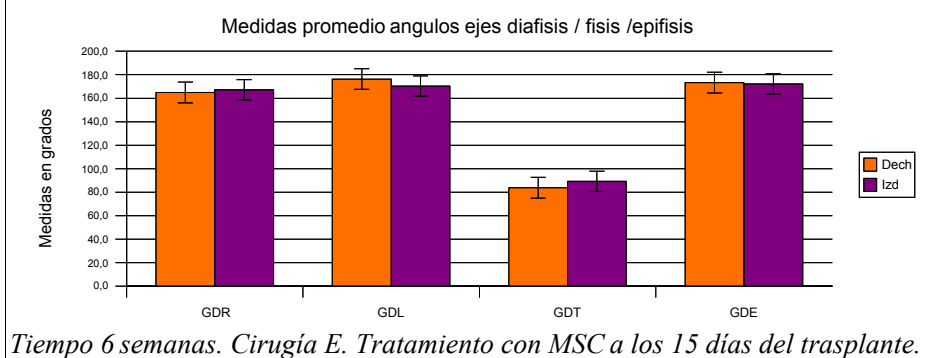
Tabla 5.5.49: Medidas comparativas de los ángulos de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.1.1	163,9	164,9	174,6	173,2	83,6	93,4	168,9	175,2
E15.1.2	163,0	162,9	176,0	151,7	79,8	124,6	175,8	156,8
E15.1.3	165,3	174,9	179,8	172,5	87,2	78,7	176,3	173,4
E15.1.4	166,0	166,6	178,9	179,4	86,8	79,3	170,4	176,6
E15.1.5	163,1	170,7	173,4	175,8	80,4	84,6	173,2	174,6
E15.1.6	167,6	163,6	175,0	169,1	85,0	75,6	175,0	176,2
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	1,16	t cal =	1,52	t cal =	0,66	t cal =	0,29

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Cirugía E. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de los parámetros angulares, (Tabla 5.5.49) no muestra diferencias significativas en ninguno de los casos. Se corrobora la observación radiológica de estos casos, en que las manos apenas mostraban desviaciones.

Ilustración 5.5.28: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico de la ilustración 5.5.28, se muestran las medidas angulares promedio de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis para ambas extremidades, muy similares en ambos casos.

Grupo E15. Tiempo 12 semanas

Caso E15.2.1 Radiológicamente se observa una mano desviada, mano zamba radial, con un incurvamiento del cúbito, en el tercio distal producido por el radio. La zona que corresponde a la placa impacta en la cortical interna del cúbito produciendo una curvación de este. La fisis radial esta en posición “minus” con respecto al cúbito. Se aprecia un

acortamiento de la extremidad superior en el radio intervenido. La epífisis del radio conserva su estructura normal. En región que correspondería a la placa de crecimiento se observa una imagen de radio-transparencia homogénea, con un patrón de normalidad y algo mas ancha que la zona que correspondería a la fisis cubital. En zona diafisaria media se aprecia una imagen de alteración medular con un ensanchamiento pronunciado a este nivel (Fig 5.5.34)

Caso E15.2.2 Radiológicamente se observa también en este caso una mano desviada, mano zamba radial, con un incurvamiento del cúbito en el tercio distal. La fisis radial esta en posición “minus” con respecto al cúbito. Se aprecia un acortamiento de la extremidad superior en el radio intervenido. La epífisis del radio esta alterada en la zona contigua a la fisis y algo más estrecha. En región que correspondería a la placa de crecimiento se observa una imagen de radio-transparencia que forma una banda ancha de un lado a otro. En la zona metafisaria, limitando la zona translúcida hay una zona radio-condensante central, que la separa parcialmente del resto del tejido medular de la metáfisis. En zona diafisaria se aprecia una alteración de las corticales y un ensanchamiento a nivel medio (Fig 5.5.35)

Caso E15.2.3 Radiológicamente se observa también en este caso una mano desviada, mano zamba radial. La fisis radial esta en posición “minus” con respecto al cúbito. La región fiso-metafisaria ha producido un ensanchamiento que impacta en el cúbito produciendo una alteración en las corticales de este. La fiso-metafisaria no es homogénea, se alternan zonas opacas con zonas translúcidas. (Fig 5.5.36)

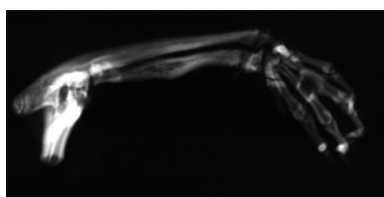


Fig 5.5.34. Caso E15.2.1

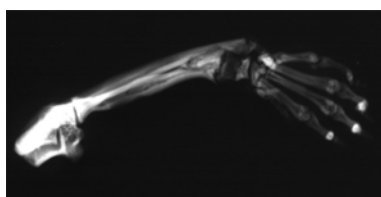


Fig 5.5.35. Caso E15.2.2

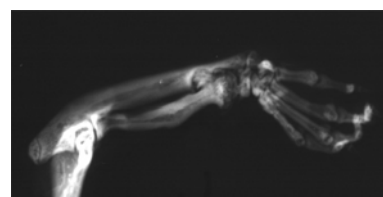


Fig 5.5.36. Caso E15.2.3

Caso E15.2.4. Se observa una mano zamba con desviación radial, con incurvamiento del cúbito, en el tercio distal. Hay un acortamiento de la extremidad. Se observa discreta alteración en la epífisis distal del radio aunque mantiene la congruencia con la región carpiana. En zona de la muñeca se observa que la fisis del cúbito es plus, la epífisis distal del radio es más pequeña pero congruente con la región carpiana. Subyacente a la epífisis se observa una imagen de radio-transparencia en la zona que debiera corresponder a la fisis, con puntos radio-condensantes en zona proximal y periférica. Las corticales de esta zona se encuentran insufladas con imágenes, en ambos lados, de pequeñas muescas, la cortical externa de esta área es más radio-condensante que la cortical interna más translúcida. (Fig 5.5.37)

Resultados

Caso E15.2.5. Radiológicamente se observa una mano zamba con desviación radial, con un incurvamiento del cúbito. Se observa alteración en la epífisis distal del radio aunque mantiene la congruencia con la región carpiana. En la región fiso-metafisaria se observa una gran imagen radio-condensante con puntos de radio-transparencia. Las corticales de esta zona se encuentran insufladas la cortical interna de esta área es más radio-condensante que la cortical externa que es más radio-translúcida. (Fig 5.5.38)

Caso E15.2.6. Radiológicamente se observa una mano zamba con desviación radial, con un incurvamiento pronunciado del cúbito, en el tercio distal producido por el radio. Hay un acortamiento de la extremidad. Se observa alteración en la epífisis distal del radio aunque mantiene la congruencia con la región carpiana. En la zona de la muñeca se observa que la fisis del radio y cúbito se encuentran al mismo nivel. Subyacente a la epífisis, en la zona que debiera corresponder a la fisis, se observa una imagen donde se alternan zonas de radio-transparencia con zonas de radio-condensación. (Fig 5.5.39)

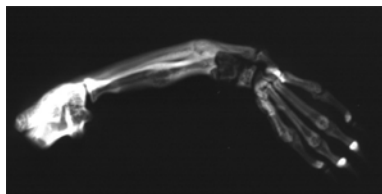


Fig 5.5.37. Caso E15.2.4

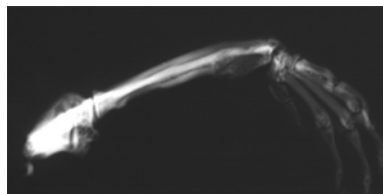


Fig 5.5.38. Caso E15.2.5

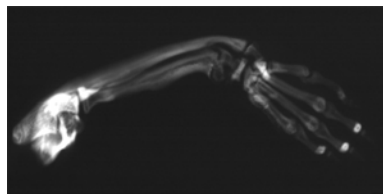


Fig 5.5.39. Caso E15.2.6

Tabla 5.5.50: Medidas de la articulación trasplantada.

	E15.2.1 lzd.	E15.2.2 lzd.	E15.2.3 lzd.	E15.2.4 lzd.	E15.2.5 lzd.	E15.2.6 lzd.	Media	Desvest
LC	27,51	27,64	24,49	26,76	27,45	27,76	26,93	1,25
LR	17,44	18,72	16,47	17,13	19,00	17,88	17,77	0,96
LPR	9,89	11,24	8,38	10,79	11,01	12,42	10,62	1,37
LDR	7,24	7,44	7,99	6,40	7,34	5,47	6,98	0,90
LPI	1,07	2,37	1,37	3,10	0,49	0,81	1,53	1,00
LPM	0,91	2,26	1,10	2,30	0,24	1,18	1,33	0,80
LPE	0,83	2,46	1,72	2,81	1,24	0,78	1,64	0,85
LEI	0,91	0,55	0,78	0,73	0,38	0,38	0,62	0,22
LEE	1,06	0,99	0,92	1,18	0,57	0,71	0,90	0,23
ADR	1,64	1,08	1,89	1,87	1,68	1,63	1,63	0,29
AMR	1,27	2,17	2,03	2,23	2,23	2,20	2,02	0,38
APP	1,25	2,29	1,91	2,09	1,69	2,62	1,98	0,48
APD	1,45	2,18	1,78	1,73	1,74	1,63	1,75	0,24
AEM	1,62	1,80	1,87	1,86	1,75	1,85	1,79	0,10
GDR	165,94	154,05	172,40	146,70	153,93	149,98	157,16	9,90
GDL	160,86	156,11	166,43	161,39	153,25	155,26	158,88	4,90
GDT	65,95	68,90	68,71	73,48	62,11	71,44	68,43	4,02
GDE	161,55	161,00	167,32	160,08	142,57	162,34	159,14	8,51

Casos de la serie E, con células MSC a los 15 días del trasplante y un tiempo de 12 semanas.

Tabla 5.5.51: Medidas de la articulación control

	E15.2.1	E15.2.2	E15.2.3	E15.2.4	E15.2.5	E15.2.6		
	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Media	Desvest
LC	30,96	31,67	31,06	32,63	31,45	32,39	31,69	0,69
LR	24,49	24,88	24,39	25,03	24,98	25,19	24,83	0,32
LPR	10,98	11,83	10,30	12,08	11,07	9,98	11,04	0,82
LDR	13,42	12,95	14,22	12,89	13,64	15,28	13,73	0,90
LPI	0,25	0,30	0,22	0,27	0,28	0,30	0,27	0,03
LPM	0,38	0,17	0,22	0,32	0,25	0,30	0,27	0,08
LPE	0,32	0,37	0,30	0,30	0,31	0,44	0,34	0,05
LEI	0,60	0,52	0,61	0,62	0,78	0,71	0,64	0,09
LEE	0,91	0,92	1,11	1,25	1,11	1,02	1,05	0,13
ADR	0,63	0,71	0,83	0,94	0,88	0,71	0,78	0,12
AMR	1,45	1,55	1,27	1,38	1,63	1,65	1,49	0,15
APP	1,54	1,56	1,22	1,43	1,79	1,62	1,53	0,19
APD	1,51	1,69	1,65	1,69	1,85	1,58	1,66	0,12
AEM	1,64	1,92	1,52	1,87	2,00	1,79	1,79	0,18
GDR	169,46	173,57	159,94	177,62	172,93	165,77	169,88	6,30
GDL	172,88	175,20	170,60	173,70	173,64	169,31	172,55	2,19
GDT	84,20	85,84	84,90	84,51	88,53	82,70	85,11	1,96
GDE	172,60	175,01	160,55	168,98	166,38	166,19	168,29	5,14

Casos de la serie E, con células MSC a los 15 días del trasplante y un tiempo de 12 semanas.

Tabla 5.5.52: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades

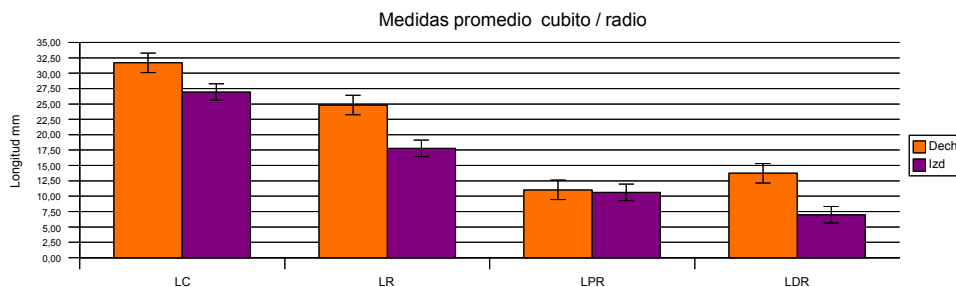
Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	lzd	Dech	lzd	Dech	lzd	Dech	lzd
E15.2.1	30,96	27,51	24,49	17,44	10,98	9,89	13,42	7,24
E15.2.2	31,67	27,64	24,88	18,72	11,83	11,24	12,95	7,44
E15.2.3	31,06	24,49	24,39	16,47	10,30	8,38	14,22	7,99
E15.2.4	32,63	26,76	25,03	17,13	12,08	10,79	12,89	6,40
E15.2.5	31,45	27,45	24,98	19,00	11,07	11,01	13,64	7,34
E15.2.6	32,39	27,76	25,19	17,88	9,98	12,42	15,28	5,47
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	9,59	t cal =	20,74	t cal =	0,66	t cal =	10,78

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.52), de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio, muestra diferencias significativas muy acusadas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la longitud del cúbito, radio y longitud del eje distal del radio entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Resultados

Ilustración 5.5.29: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Tiempo 12 semanas. Cirugía E. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante.

En Ilustración 5.5.29, se indican los promedios de las longitudes de cúbito y radio (porcentaje de error del 5 %). En el patrón estructural normal el eje distal del radio (LDR) es mayor que el eje proximal (LPR), en la extremidad intervenida está invertido y el eje proximal es más largo que el distal. El resultado es el mismo que el observado en la serie E, con tratamiento con MSC en el momento del trasplante, para el mismo tiempo de valoración.

Tabla 5.5.53: Medidas de las longitudes de la placa, interior, media y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.2.1	0,25	1,07	0,38	0,91	0,32	0,83
E15.2.2	0,30	2,37	0,17	2,26	0,37	2,46
E15.2.3	0,22	1,37	0,22	1,10	0,30	1,72
E15.2.4	0,27	3,10	0,32	2,30	0,30	2,81
E15.2.5	0,28	0,49	0,25	0,24	0,31	1,24
E15.2.6	0,30	0,81	0,3	1,18	0,44	0,78
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	3,10	t cal =	3,15	t cal =	3,65

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas en mm.

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la placa en las tres secciones medidas, (Tabla 5.5.53) indica diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la longitud de la placa en los 3 casos.

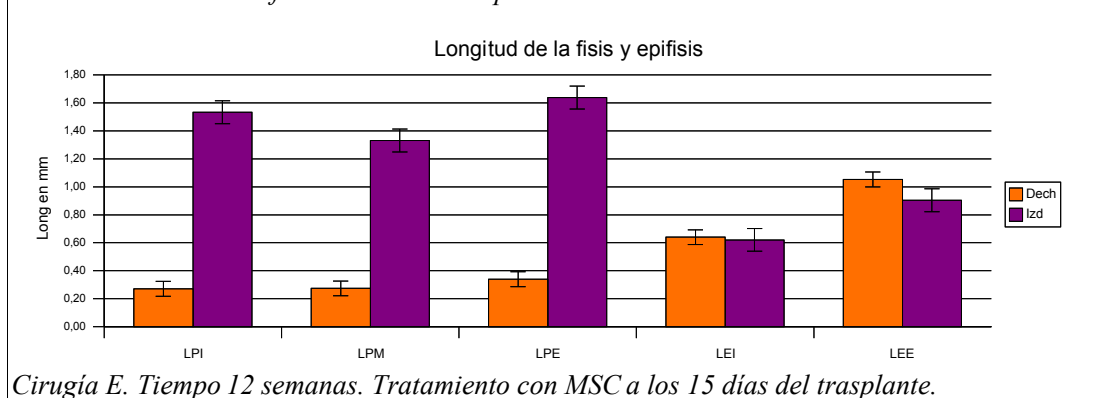
Tabla 5.5.54: Medidas de las longitudes de la epífisis interior y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long epifisis int LEI		Long epifisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.2.1	0,6	0,91	0,91	1,06
E15.2.2	0,52	0,55	0,92	0,99
E15.2.3	0,61	0,78	1,11	0,92
E15.2.4	0,62	0,73	1,25	1,18
E15.2.5	0,78	0,38	1,11	0,57
E15.2.6	0,71	0,38	1,02	0,71
	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	0,16	t cal =	1,41

Estadística mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas en mm.

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la epífisis (Tabla 5.5.54) no muestra diferencias significativas entre la mano intervenida y la mano control.

Ilustración 5.5.30: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico de la ilustración 5.5.30, se indican las medidas promedio de la fisis y epífisis de ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). La longitud de la placa es mayor en la extremidad intervenida que en la extremidad control en todas las secciones medidas. La longitud de la epífisis no muestra grandes diferencias.

Tabla 5.5.55: Medidas comparativas de la anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.

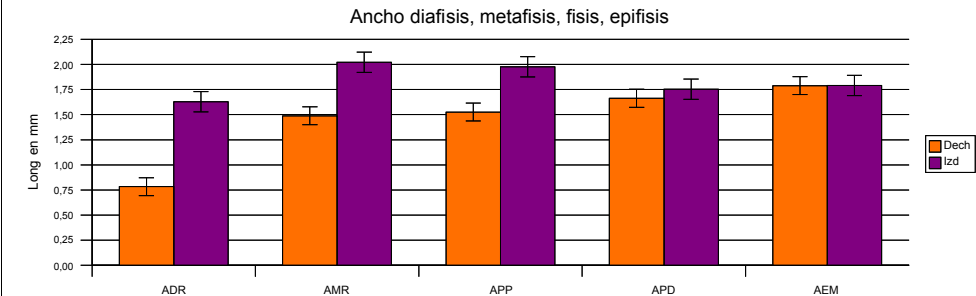
Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMR		A placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.2.1	0,63	1,64	1,45	1,27	1,54	1,25	1,51	1,45	1,64	1,62
E15.2.2	0,71	1,08	1,55	2,17	1,56	2,29	1,69	2,18	1,92	1,8
E15.2.3	0,83	1,89	1,27	2,03	1,22	1,91	1,65	1,78	1,52	1,87
E15.2.4	0,94	1,87	1,38	2,23	1,43	2,09	1,69	1,73	1,87	1,86
E15.2.5	0,88	1,68	1,63	2,23	1,79	1,69	1,85	1,74	2,00	1,75
E15.2.6	0,71	1,63	1,65	2,2	1,62	2,62	1,58	1,63	1,79	1,85
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 8,25		t cal = 3,54		t cal = 2,11		t cal = 1,01		t cal = 0,03	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm

El análisis estadístico comparativo de los parámetros de anchura medidos, (Tabla 5.5.55) muestra diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la anchura de la diáfisis (ADR) y metáfisis (AMR) entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Resultados

Ilustración 5.5.31: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía E. Tiempo 12 semanas. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante.

En ilustración 5.5.31, los promedios de anchura de diáfisis, metafisis, fisis y epífisis (porcentaje de error del 5 %) son mayores en la extremidad intervenida que en el control.

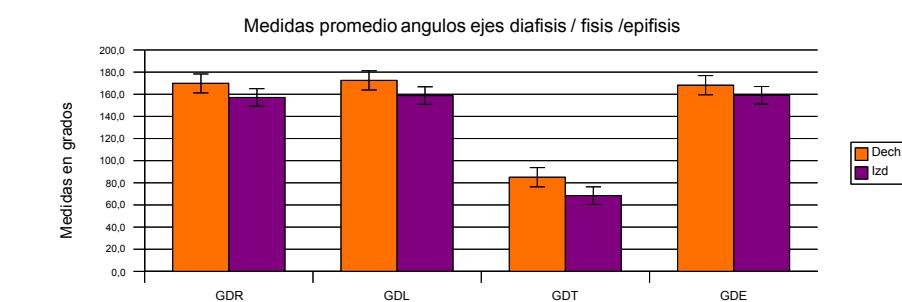
Tabla 5.5.56: Medidas comparativas de los ángulos de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades

Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.2.1	169,5	165,9	172,9	160,9	84,2	65,9	172,6	161,5
E15.2.2	173,6	154,0	175,2	156,1	85,8	68,9	175,0	161,0
E15.2.3	159,9	172,4	170,6	166,4	84,9	68,7	160,6	167,3
E15.2.4	177,6	146,7	173,7	161,4	84,5	73,5	169,0	160,1
E15.2.5	172,9	153,9	173,6	153,2	88,5	62,1	166,4	142,6
E15.2.6	165,8	150,0	169,3	155,3	82,7	71,4	166,2	162,3
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	2,06	t cal =	5,75	t cal =	7,25	t cal =	2,19

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de los parámetros angulares medidos, (Tabla 5.5.56) muestra diferencias significativas en el ángulo formado por el eje de la diáfisis con el eje de la placa tanto longitudinal (GLD) como transversal (GDT). Se corrobora la observación radiológica en que todos los casos de este grupo mostraban desviación radial de la mano.

Ilustración 5.5.32: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía E. Tiempo 12 semanas. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante.

En el gráfico 5.5.32, se muestran las medidas angulares promedio de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis para ambas extremidades. Los ángulos en la extremidad intervenida son más pequeños que en el control corroborando el incurvamiento radial y de la mano.

Grupo E15. Tiempo 24 semanas

Caso E15.3.1 Radiológicamente se observa un acortamiento de la extremidad sin apenas desviación. La fisis radial esta en posición ligeramente “minus” con respecto a la fisis cubital. La epífisis del radio aparece ensanchada en la zona interna. Las corticales internas de cúbito y radio aparecen alteradas, el cúbito aparece ensanchado e impacta en el radio produciendo alteraciones en su región interna. No hay grandes cambios óseos. (Fig 5.5.40)

Caso E15.3.2 Radiológicamente se observa que la fisis radial y cubital están a igual altura, y no hay desviación de la mano. El caso presenta un patrón de normalidad sin grandes cambios óseos. Se observa alteración en la imagen de radio condensación a la altura de la metáfisis radial, en esta zona se alternan zonas opacas con zonas translúcidas. (Fig 5.5.41)

Caso E15.3.3 Radiológicamente se observa que la fisis radial y cubital están a igual altura, hay una ligera desviación radial. El caso presenta un patrón de normalidad sin grandes cambios óseos. La zona que corresponde a la placa, que por la edad del animal debería estar cerrada, presenta una zona de mayor radio-transparencia en su zona central, con formaciones más opacas en sentido longitudinal que hacen pensar en la formación de puentes óseos. (Fig 5.5.42)

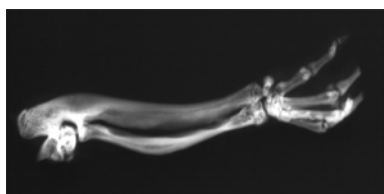


Fig 5.5.40. Caso E15.3.1

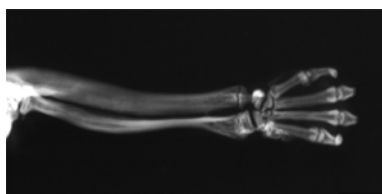


Fig 5.5.41. Caso E15.3.2

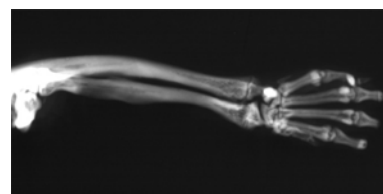


Fig 5.5.42. Caso E15.3.3

Caso E15.4.5 Radiológicamente se observa que la fisis radial y cubital están a igual altura, hay una ligera desviación radial de la mano. El caso presenta un patrón de normalidad sin grandes cambios óseos. Se observa alteración en la imagen de radio condensación a la altura de la metáfisis radial, en esta zona se alternan zonas opacas con zonas translúcidas, que inducen a pensar en una deficiente osificación. (Fig 5.5.43)

Resultados

Caso E15.3.5 Radiológicamente se observa que la fisis radial y cubital están a igual altura, y no hay desviación de la mano. El caso presenta un patrón de normalidad sin grandes cambios óseos. significativos. Se observa alteración en la imagen de radio condensación a la altura de la metáfisis radial, en esta zona se alternan zonas opacas con zonas translúcidas en región medular y externa. (Fig 5.5.44)

Comparando las radiografía de uno de los casos, de la extremidad normal no intervenida, (Fig 5.5.43), llama la atención en el grupo el patrón de normalidad mostrado en los casos.

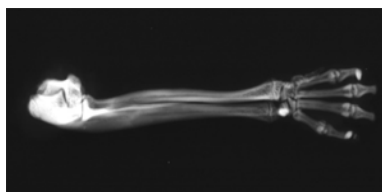


Fig 5.5.43. Caso E15.3.4 control

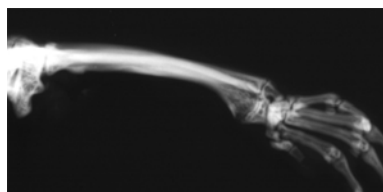


Fig 5.5.44. Caso E15.3.4

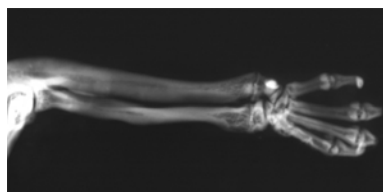


Fig 5.5.45. Caso E15.3.5

Tabla 5.5.57: Medidas de la articulación trasplantada.

	E15.3.1	E15.3.2	E15.3.3	E15.3.4	E15.3.5	E15.3.6		
	lzd.	lzd.	lzd.	lzd.	lzd.	lzd.	Media	Desvest
LC	29,95	30,91	29,96	29,85	30,93	29,86	30,24	0,53
LR	22,88	24,36	22,72	21,39	22,12	22,15	22,60	1,01
LPR	11,18	10,47	15,27	12,77	10,93	11,86	12,08	1,76
LDR	12,12	14,07	7,69	8,70	11,12	9,59	10,55	2,36
LPI	0,04	0,13	0,37	0,26	0,19	0,20	0,20	0,11
LPM	0,04	0,13	0,64	0,12	0,16	0,15	0,21	0,22
LPE	0,06	0,27	0,14	0,67	0,06	0,01	0,20	0,24
LEI	1,23	1,07	1,03	1,04	1,17	1,09	1,10	0,08
LEE	1,33	1,48	1,68	1,73	1,63	1,60	1,57	0,15
ADR	1,23	0,68	0,88	1,41	1,09	1,08	1,06	0,26
AMR	1,72	1,88	1,51	2,23	1,86	1,88	1,85	0,24
APP	1,72	1,92	1,70	2,18	1,93	1,91	1,89	0,18
APD	1,72	2,17	1,78	2,22	1,97	2,04	1,98	0,20
AEM	1,85	1,98	2,06	1,85	2,09	1,98	1,97	0,10
GDR	156,05	166,16	167,94	153,54	173,87	165,23	163,80	7,64
GDL	171,25	162,90	176,67	173,44	173,87	171,56	171,62	4,69
GDT	95,63	95,68	90,36	73,84	87,56	86,63	88,29	8,06
GDE	170,13	158,25	155,37	167,37	163,74	164,23	163,18	5,52

Casos de la serie E, con células MSC a los 15 días del trasplante y un tiempo de 24 semanas.

Tabla 5.5.58: Medidas de la articulación control.

	E15.3.1	E15.3.2	E15.3.3	E15.3.4	E15.3.5	E15.3.6		
	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Media	Desvest
LC	33,51	32,67	33,20	32,75	31,87	32,66	32,77	0,56
LR	26,62	25,96	26,43	26,10	25,12	25,41	25,94	0,58
LPR	11,23	11,38	12,03	13,02	12,38	11,97	12,00	0,66
LDR	15,21	14,52	14,49	13,00	12,73	14,13	14,01	0,96
LPI	0,07	0,13	0,04	0,05	0,10	0,04	0,07	0,03
LPM	0,06	0,08	0,06	0,03	0,06	0,06	0,06	0,02
LPE	0,04	0,13	0,05	0,07	0,10	0,05	0,07	0,03
LEI	0,77	0,78	1,05	0,84	0,87	0,90	0,87	0,10
LEE	1,16	1,08	1,24	1,23	1,26	1,13	1,18	0,07
ADR	0,94	0,84	1,10	1,07	1,03	1,05	1,00	0,10
AMR	1,75	1,52	1,96	1,69	1,64	1,72	1,71	0,15
APP	1,83	1,57	2,11	1,71	1,70	1,78	1,78	0,18
APD	1,96	1,80	2,67	1,82	1,80	1,94	2,00	0,34
AEM	1,95	1,89	2,02	1,99	1,99	1,96	1,97	0,05
GDR	170,58	170,55	175,82	176,51	169,47	171,55	172,41	2,99
GDL	172,94	171,63	167,89	175,37	178,07	174,24	173,36	3,47
GDT	89,29	82,24	79,55	84,21	80,53	83,25	83,18	3,45
GDE	164,33	176,19	168,50	170,55	168,71	169,23	169,58	3,85

Casos de la serie E, con células MSC a los 15 días del trasplante y un tiempo de 24 semanas.

Tabla 5.5.59: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades.

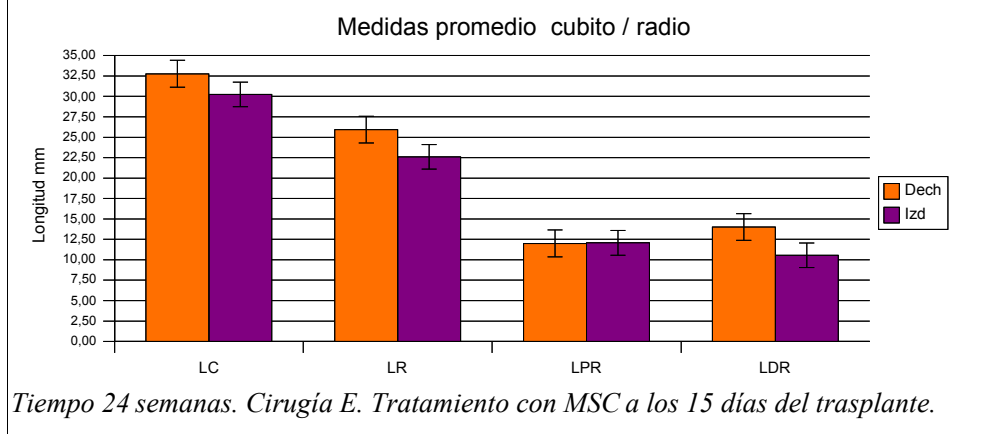
Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.3.1	33,51	29,95	26,62	22,88	11,23	11,18	15,21	12,12
E15.3.2	32,67	30,91	25,96	24,36	11,38	10,47	14,52	14,07
E15.3.3	33,20	29,96	26,43	22,72	12,03	15,27	14,49	7,69
E15.3.4	32,75	29,85	26,10	21,39	13,02	12,77	13,00	8,70
E15.3.5	31,87	30,93	25,12	22,12	12,38	10,93	12,73	11,12
E15.3.6	32,66	29,86	25,41	22,15	11,97	11,86	14,13	9,59
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 6,26		t cal = 7,91		t cal = 0,12		t cal = 3,74	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 24 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.59), de las longitudes del cúbito (LC), radio (LR), eje proximal (LPR) y distal del radio (LDR), muestra diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la longitud del cúbito, radio y longitud del eje distal del radio entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Resultados

Ilustración 5.5.33: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.33) se indican las medidas promedio de las longitudes de cúbito, radio, eje proximal y eje distal de radio para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). Llama la atención en estos casos que las diferencias con el control no son tan acusadas en contra de lo que cabría esperar para un tiempo de 24 semanas post-trasplante.

Tabla 5.5.60: Medidas comparativas de las longitudes de la placa, interior, media y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.3.1	0,07	0,04	0,06	0,04	0,04	0,06
E15.3.2	0,13	0,13	0,08	0,13	0,13	0,27
E15.3.3	0,04	0,37	0,06	0,64	0,05	0,14
E15.3.4	0,05	0,26	0,03	0,12	0,07	0,67
E15.3.5	0,10	0,19	0,06	0,16	0,10	0,06
E15.3.6	0,04	0,2	0,06	0,15	0,05	0,01
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	2,39	t cal =	1,67	t cal =	1,32

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía E. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 24 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la placa en las tres secciones medidas, (Tabla 5.5.60) no indica diferencias significativas en la longitud de la placa entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

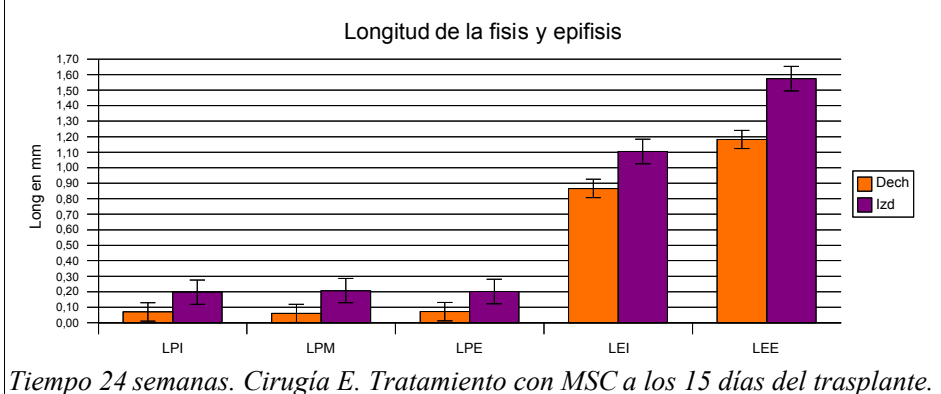
Tabla 5.5.61: Medidas de las longitudes de la epífisis interior y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long epífisis int LEI		Long epífisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.3.1	0,77	1,23	1,16	1,33
E15.3.2	0,78	1,07	1,08	1,48
E15.3.3	1,05	1,03	1,24	1,68
E15.3.4	0,84	1,04	1,23	1,73
E15.3.5	0,87	1,17	1,26	1,63
E15.3.6	0,90	1,09	1,13	1,60
	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	3,67	t cal =	8,23

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la epífisis (Tabla 5.5.61) muestra diferencias significativas entre la extremidad intervenida y la extremidad control en ambos parámetros medidos.

Ilustración 5.5.34: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico de la ilustración 5.5.34, se indican las medidas promedio de la fisis y epífisis de ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). La longitud de la placa y de la epífisis es mayor en la extremidad intervenida que en la extremidad control en todas las secciones medidas.

Si comparamos este gráfico con el obtenido en la valoración de la longitud de la fisis a las 12 semanas (ilustración 5.5.30) para el mismo grupo de ensayos, vemos la diferencia en la longitud de la placa, confirmando que a las 24 semanas la fisis en la rata está prácticamente cerrada.

Resultados

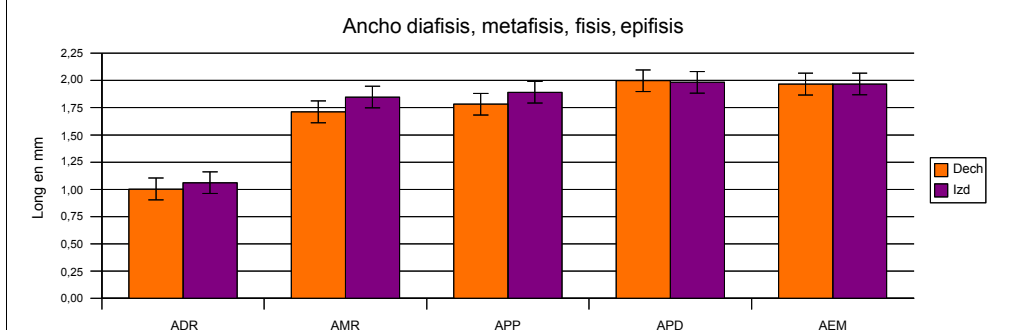
Tabla 5.5.62: Medidas comparativas de la anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMR		A placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.3.1	0,94	1,23	1,75	1,72	1,83	1,72	1,96	1,72	1,95	1,85
E15.3.2	0,84	0,68	1,52	1,88	1,57	1,92	1,80	2,17	1,89	1,98
E15.3.3	1,10	0,88	1,96	1,51	2,11	1,70	2,67	1,78	2,02	2,06
E15.3.4	1,07	1,41	1,69	2,23	1,71	2,18	1,82	2,22	1,99	1,85
E15.3.5	1,03	1,09	1,64	1,86	1,70	1,93	1,80	1,97	1,99	2,09
E15.3.6	1,05	1,08	1,72	1,88	1,78	1,91	1,94	2,04	1,96	1,98
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	0,62	t cal =	0,95	t cal =	0,83	t cal =	0,07	t cal =	0,02

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 24 semanas. Medidas reales en mm

El análisis estadístico comparativo de los parámetros de anchura medidos, (Tabla 5.5.62) no muestra diferencias significativas en ninguno de los casos entre la extremidad intervenida y la extremidad control. Los resultados obtenidos en la anchura de los huesos implicados corrobora los parámetros de normalidad mostrados en este grupo.

Ilustración 5.5.35: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Tiempo 24 semanas. Cirugía E. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante.

En el gráfico de la ilustración 5.5.35, se indican las medidas promedio de la anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis (porcentaje de error del 5 %). El promedio de todas las mediciones indicadas es igual o ligeramente mayor en la extremidad intervenida que en la extremidad control. Lo que confirma el patrón de normalidad de la valoración radiológica obtenida para este grupo.

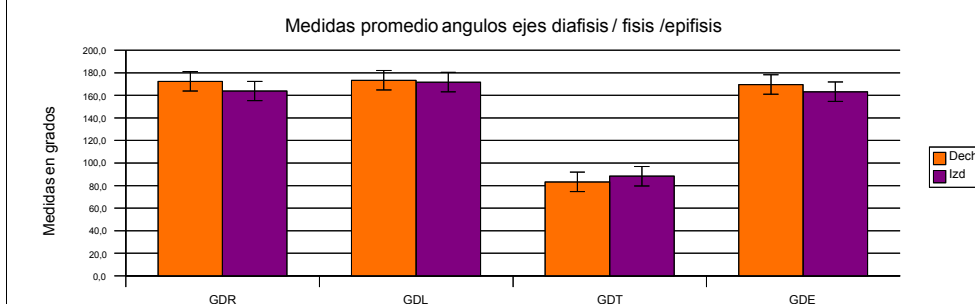
Tabla 5.5.63: Medidas comparativas de los ángulos de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
E15.3.1	170,6	156,0	172,9	171,3	89,3	95,6	164,3	170,1
E15.3.2	170,6	166,2	171,6	162,9	82,2	95,7	176,2	158,3
E15.3.3	175,8	167,9	167,9	176,7	79,6	90,4	168,5	155,4
E15.3.4	176,5	153,5	175,4	173,4	84,2	73,8	170,6	167,4
E15.3.5	169,5	173,9	178,1	173,9	80,5	87,6	168,7	163,7
E15.3.6	171,6	165,2	174,2	171,6	83,3	86,6	169,2	164,2
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 2,26		t cal = 0,74		t cal = 1,50		t cal = 1,90	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 24 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de los parámetros angulares medidos, (Tabla 5.5.63) no muestra diferencias significativas entre la extremidad intervenida y la extremidad control. Se corrobora la observación radiológica en que ningún caso mostraba desviación radial de la mano.

Ilustración 5.5.36: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Tiempo 24 semanas. Cirugía E. Tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante.

En el gráfico de la ilustración 5.5.36, se muestran las medidas angulares promedio de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis para ambas extremidades. Las mediciones son muy similares en ambos casos.

5.5.4 Serie JC sin terapia celular

Esta serie se corresponde con animales a los que se les realizó el trasplante de la fisis radial con el anillo pericondral y un resto de hueso metafisario. Los animales no recibieron terapia celular.

Grupo JC. Tiempo 6 semanas

Los casos estudiados los podemos agrupar en tres tipos de respuesta, que responden a las 3 imágenes mostradas. Radiológicamente se observa que la fisis del radio esta posicionalmente retrasada, en posición muy “minus” con respecto a la fisis del cúbito. El cúbito crece más que el radio y eso hace que la mano se desvíe hacia el radio dando lugar a una mano zamba radial. Hay un crecimiento irregular en la zona metafisaria, que hace una impronta en el cúbito y lo desplaza produciendo una ligera curvatura, que contribuye a aumentar la desviación radial. (Fig 5.5.46)



Fig 5.5.46. Caso JC.1.9

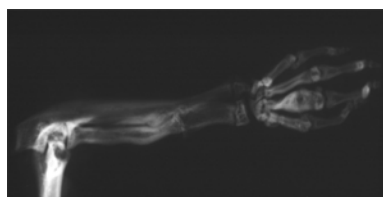


Fig 5.5.47. Caso JC.1.10

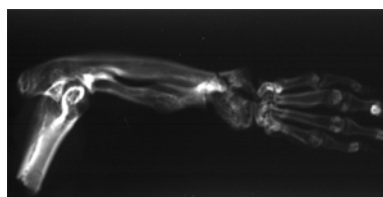


Fig 5.5.48. Caso J.C.14

Radiológicamente se observa la fisis del radio posicionalmente a igual nivel que la fisis cubital y no hay desviación de la mano. Hay aparentemente un crecimiento óseo a partir del injerto, limitado por un puente óseo a nivel de la diáfisis. Hay un crecimiento en la zona metafisaria que dibuja una zona de condensación en las corticales y translúcida en la zona medular que induce a pensar en falta de osificación. (Fig 5.5.47)

Radiológicamente se observa un crecimiento irregular a nivel de la fisis radial que afecta también a la fisis cubital. El injerto produce un crecimiento en anchura que impacta con el cúbito produciendo alteraciones en este a nivel de la fisis. Hay un crecimiento irregular en anchura la zona metafisaria. (Fig 5.5.48)

Tabla 5.5.64: Medidas de la articulación intervenida.

	JC.1.1 lzd.	JC.1.2 lzd.	JC.1.3 lzd.	JC.1.4 lzd.	JC.1.5 lzd.	JC.1.6 lzd.	Media	Desvest
LC	21,23	26,96	24,51	28,19	28,99	23,38	25,54	3,01
LR	14,53	19,30	15,37	20,17	22,17	14,67	17,70	3,26
LPR	8,58	11,18	8,30	12,46	11,53	8,96	10,17	1,77
LDR	5,79	8,22	6,70	7,80	10,85	5,99	7,56	1,88
LPI	0,03	0,15	0,12	0,15	0,25	0,20	0,15	0,08
LPM	0,01	0,10	0,07	0,10	0,17	0,17	0,10	0,06
LPE	0,04	0,20	0,05	0,26	0,54	0,12	0,20	0,19
LEI	1,02	0,60	1,22	0,78	1,03	1,81	1,08	0,42
LEE	1,25	0,75	2,12	1,22	1,41	1,02	1,29	0,46
ADR	1,80	1,98	2,22	1,51	2,22	1,46	1,87	0,34
AMR	1,80	1,80	1,56	2,17	2,23	2,01	1,93	0,26
APP	1,70	1,46	1,43	1,87	2,38	2,10	1,82	0,37
APD	1,66	1,85	1,83	1,97	2,35	2,37	2,00	0,29
AEM	1,86	1,65	2,73	2,07	2,25	2,24	2,13	0,37
GDR	159,59	169,58	172,90	166,95	163,94	153,80	164,46	6,95
GDL	179,34	169,46	171,53	174,62	169,06	165,95	171,66	4,73
GDT	68,17	70,79	76,95	88,38	99,04	72,58	79,32	11,99
GDE	151,34	170,56	176,42	175,65	164,11	176,92	169,17	10,00

Casos de la serie J, sin tratamiento celular y un tiempo de 6 semanas.

Tabla 5.5.65: Medidas de la articulación control.

	JC.1.1 Dech	JC.1.2 Dech	JC.1.3 Dech	JC.1.4 Dech	JC.1.5 Dech	JC.1.6 Dech	Media	Desvest
LC	30,56	32,32	28,79	31,36	32,05	28,68	30,62	1,59
LR	23,55	25,11	24,66	24,16	24,26	22,28	24,00	0,99
LPR	10,39	12,75	11,37	11,93	10,70	10,37	11,25	0,95
LDR	13,21	12,25	13,16	12,26	13,81	12,01	12,78	0,71
LPI	0,47	0,18	0,50	0,20	0,49	0,35	0,36	0,15
LPM	0,40	0,25	0,27	0,24	0,26	0,29	0,29	0,06
LPE	0,25	0,38	0,62	0,44	0,63	0,15	0,41	0,19
LEI	0,78	1,86	0,85	0,71	0,87	0,72	0,97	0,44
LEE	1,15	2,03	1,26	1,14	1,24	0,97	1,30	0,37
ADR	1,06	1,66	1,06	0,97	1,16	0,92	1,14	0,27
AMR	1,30	2,00	1,62	1,63	1,74	1,34	1,60	0,26
APP	1,18	2,00	1,68	1,59	1,73	1,30	1,58	0,30
APD	1,30	2,05	1,96	1,72	1,90	1,43	1,73	0,30
AEM	1,39	2,07	1,96	1,93	2,05	1,36	1,79	0,33
GDR	162,37	175,57	166,22	169,91	161,57	161,64	166,21	5,63
GDL	169,87	169,62	176,78	174,45	176,51	177,75	174,16	3,59
GDT	83,99	79,24	88,68	79,64	78,60	94,97	84,19	6,53
GDE	163,58	169,24	166,52	167,86	167,14	174,59	168,16	3,67

Casos de la serie J, sin tratamiento celular y un tiempo de 6 semanas.

Tabla 5.5.66: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades.

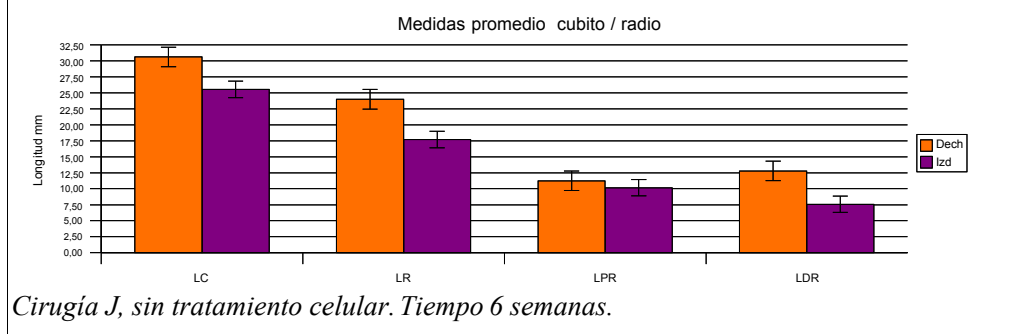
Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	lzd	Dech	lzd	Dech	lzd	Dech	lzd
JC.1.1	30,56	21,23	23,55	14,53	10,39	8,58	13,21	5,79
JC.1.2	32,32	26,96	25,11	19,30	12,75	11,18	12,25	8,22
JC.1.3	28,79	24,51	24,66	15,37	11,37	8,3	13,16	6,7
JC.1.4	31,36	28,19	24,16	20,17	11,93	12,46	12,26	7,80
JC.1.5	32,05	28,99	24,26	22,17	10,70	11,53	13,81	10,85
JC.1.6	28,68	23,38	22,28	14,67	10,37	8,96	12,01	5,99
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 5,41		t cal = 5,37		t cal = 1,78		t cal = 7,62	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.66), de las longitudes del cúbito (LC), radio (LR), eje proximal (LPR) y distal del radio (LDR), muestra diferencias significativas acusadas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la longitud del cúbito, radio y longitud del eje distal del radio entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Resultados

Ilustración 5.5.37: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico 5.5.37 se indican las medidas promedio de las longitudes de cúbito, radio, eje proximal y eje distal de radio para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). En este caso como en los anteriores el eje proximal del radio (LPR) es mayor que el eje distal (LDR), en la extremidad intervenida, al contrario de lo que sucede en el control.

Tabla 5.5.67: Medidas comparativas de las longitudes de la placa, interior, media y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
JC.1.1	0,47	0,03	0,4	0,01	0,25	0,04
JC.1.2	0,18	0,15	0,25	0,1	0,38	0,20
JC.1.3	0,50	0,12	0,27	0,07	0,62	0,05
JC.1.4	0,20	0,15	0,24	0,10	0,44	0,26
JC.1.5	0,49	0,25	0,26	0,17	0,63	0,54
JC.1.6	0,35	0,20	0,29	0,17	0,15	0,12
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	3,08	t cal =	4,00	t cal =	2,69

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm.

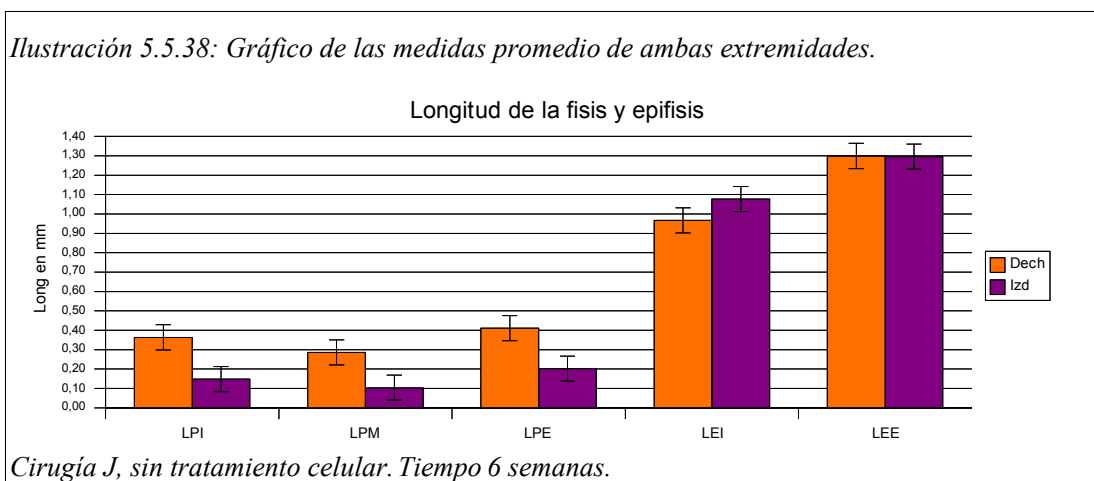
El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la placa en las tres secciones medidas, (Tabla 5.5.67) interior (LPI), media (LPM) y exterior (LPE) indica diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en los tres casos entre la extremidad intervenida y la extremidad control. En estos casos, la longitud de la fisis es significativamente más corta en la extremidad intervenida. Como podemos comprobar en el gráfico 5.5.38.

Tabla 5.5.68: Medidas comparativas de las longitudes de la epífisis interior y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long epifisis int LEI		Long epifisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
JC.1.1	0,78	1,02	1,15	1,25
JC.1.2	1,86	0,6	2,03	0,75
JC.1.3	0,85	1,22	1,26	2,12
JC.1.4	0,71	0,78	1,14	1,22
JC.1.5	0,87	1,03	1,24	1,41
JC.1.6	0,72	1,81	0,97	1,02
	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	0,35	t cal =	0,01

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 6 semanas. Medidas en mm..

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la epífisis (Tabla 5.5.68) no muestra diferencias significativas entre la extremidad intervenida y la extremidad control.



En el gráfico de la ilustración 5.5.38, se indican las medidas promedio de la fisis y epífisis de ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). La longitud de la placa es mayor en la extremidad control que en la intervenida, la epífisis por el contrario es mayor en la intervenida en su zona interior e igual en la zona externa.

Tabla 5.5.69: Medidas comparativas de la anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades

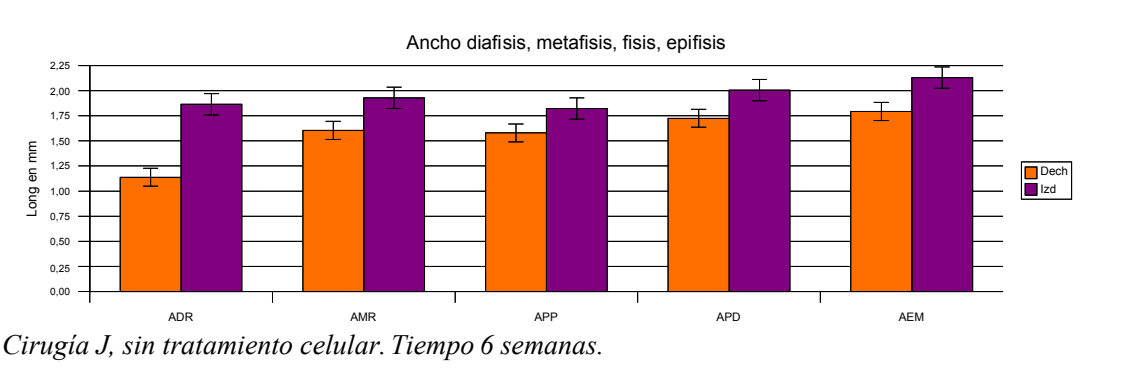
Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMRA		placa prox APPA		placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
JC.1.1	1,06	1,80	1,30	1,80	1,18	1,70	1,3	1,66	1,39	1,86
JC.1.2	1,66	1,98	2,00	1,80	2,00	1,46	2,05	1,85	2,07	1,65
JC.1.3	1,06	2,22	1,62	1,56	1,68	1,43	1,96	1,83	1,96	2,73
JC.1.4	0,97	1,51	1,63	2,17	1,59	1,87	1,72	1,97	1,93	2,07
JC.1.5	1,16	2,22	1,74	2,23	1,73	2,38	1,90	2,35	2,05	2,25
JC.1.6	0,92	1,46	1,34	2,01	1,30	2,10	1,43	2,37	1,36	2,24
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 5,45		t cal = 2,19		t cal = 1,12		t cal = 1,64		t cal = 1,74	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm..

El análisis estadístico comparativo de la anchura de la diáfisis (ADR) metáfisis (AMR) fisis proximal (APP) fisis distal (APD) y epífisis (AEM), (Tabla 5.5.69) indica diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la anchura de la diáfisis entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Resultados

Ilustración 5.5.39: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico de la ilustración 5.5.39, se indican las medidas promedio de la anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis (porcentaje de error del 5 %). El promedio de todas las medidas indicadas es mayor en la extremidad intervenida que en la extremidad control.

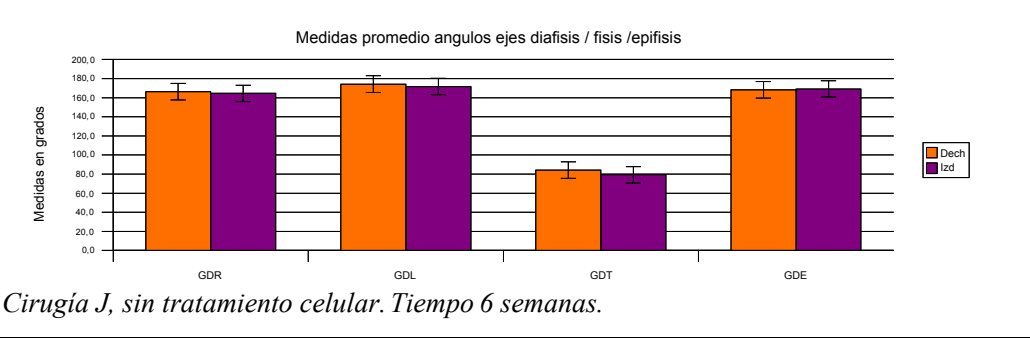
Tabla 5.5.70: Medidas comparativas de los ángulos de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
JC.1.1	162,4	159,6	169,9	179,3	84,0	68,2	163,6	151,3
JC.1.2	175,6	169,6	169,6	169,5	79,2	70,8	169,2	170,6
JC.1.3	166,2	172,9	176,8	171,5	88,7	76,9	166,5	176,4
JC.1.4	169,9	166,9	174,5	174,6	79,6	88,4	167,9	175,7
JC.1.5	161,6	163,9	176,5	169,1	78,6	99,0	167,1	164,1
JC.1.6	161,6	153,8	177,8	166,0	95,0	72,6	174,6	176,9
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 0,80		t cal = 0,83		t cal = 0,74		t cal = 0,31	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de los ángulos de los ejes diáfisis/placa y diáfisis/epífisis, (Tabla 5.5.70) no muestra diferencias en la angulación de ambas manos.

Ilustración 5.5.40: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico de la ilustración 5.5.40, se muestran las medidas angulares promedio de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis para ambas extremidades. Las medidas son muy similares en ambos casos.

Grupo JC. Tiempo 12 semanas

Los casos estudiados los podemos agrupar esquemáticamente en dos tipos de respuesta, unos casos donde se produce una desviación radial de la mano muy acusada y en otros en que la mano tiene una desviación moderada.

El acortamiento del crecimiento de la extremidad es claro, El radio no dibuja bien la diáfisis, hay un ensanchamiento de la diáfisis radial (Fig 5.5.50). Este acortamiento del radio produce desviaciones y malformaciones en el crecimiento del cúbito. La fisis del radio está posicionalmente retrasada, en posición “minus” con respecto a la fisis del cúbito. El cúbito ha crecido más que el radio y hace que la mano se desvíe hacia el radio dando lugar a una mano zamba radial (Fig 5.5.50 y 5.5.51).

En otros casos, las deformaciones de radio y cúbito, sobre todo de este último no son tan acusadas. Radiológicamente se observa una metáfisis con poca condensación medular pero con unas corticales definidas aunque algo alteradas lo que induce a pensar que el injerto ha formado hueso. En la diáfisis se observa (Fig 5.5.49) una zona de discontinuidad a nivel medio que induce a pensar en la zona de unión del resto de metáfisis que acompañaba al injerto en la técnica quirúrgica realizada en estos casos con la metáfisis del huésped.

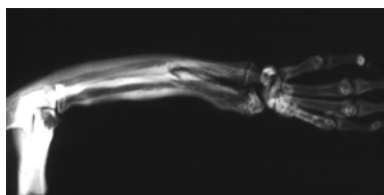


Fig 5.5.49. Caso JC.2.2

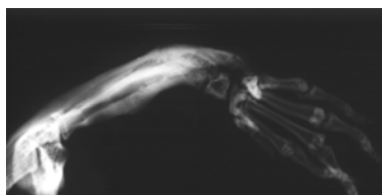


Fig 5.5.50. Caso JC.2.4

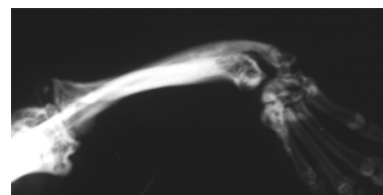


Fig 5.5.51. Caso JC.2.5

Tabla 5.5.71: Medidas de la articulación intervenida

	JC.2.1 lzd.	JC.2.2 lzd.	JC.2.3 lzd.	JC.2.4 lzd.	JC.2.5 lzd.	JC.2.6 lzd.	Media	Desvest
LC	28,98	28,34	25,61	26,29	25,79	26,06	26,84	1,44
LR	21,11	19,89	16,12	17,55	16,50	17,67	18,14	1,96
LPR	12,64	9,15	10,54	9,58	8,20	8,68	9,80	1,61
LDR	8,79	10,77	5,74	8,05	8,39	9,05	8,46	1,64
LPI	0,53	0,07	0,33	0,16	0,07	0,18	0,22	0,18
LPM	0,15	0,07	0,36	0,42	0,09	0,14	0,20	0,15
LPE	0,10	0,05	0,38	0,16	0,10	0,09	0,15	0,12
LEI	0,69	0,09	1,03	0,44	1,19	0,41	0,64	0,41
LEE	1,35	0,10	1,59	0,97	1,47	0,87	1,06	0,55
ADR	2,02	1,96	1,12	1,89	1,87	1,92	1,80	0,34
AMR	1,83	2,30	1,40	2,01	2,42	1,92	1,98	0,36
APP	2,01	2,45	1,81	1,64	2,05	2,08	2,01	0,27
APD	1,75	2,34	1,75	1,79	1,91	2,25	1,96	0,26
AEM	1,78	2,24	1,65	1,82	2,14	2,33	1,99	0,28
GDR	158,40	164,07	136,79	160,40	173,59	173,26	161,09	13,50
GDL	173,17	159,23	133,42	165,36	148,48	164,86	157,42	14,32
GDT	117,41	110,11	70,77	80,09	59,97	72,24	85,10	23,22
GDE	136,82	150,77	164,17	176,20	141,96	167,50	156,24	15,48

Casos de la serie J, sin tratamiento celular y un tiempo de 12 semanas.

Resultados

Tabla 5.5.72: Medidas de la articulación intervenida

	JC.2.1 Dech	JC.2.2 Dech	JC.2.3 Dech	JC.2.4 Dech	JC.2.5 Dech	JC.2.6 Dech	Media	Desvest
LC	33,00	32,92	33,21	31,32	31,66	31,53	32,27	0,86
LR	25,95	26,07	25,94	24,82	23,95	25,16	25,32	0,84
LPR	10,00	12,00	11,00	8,44	9,27	10,16	10,14	1,25
LDR	16,14	14,39	15,45	16,24	14,86	15,09	15,36	0,73
LPI	0,19	0,38	0,22	0,21	0,19	0,18	0,23	0,08
LPM	0,10	0,19	0,20	0,16	0,18	0,18	0,17	0,04
LPE	0,19	0,14	0,19	0,36	0,28	0,41	0,26	0,11
LEI	0,88	0,88	0,64	0,69	0,61	0,69	0,73	0,12
LEE	1,30	1,07	0,95	0,93	1,07	1,30	1,10	0,16
ADR	1,15	1,30	1,39	1,09	1,06	1,24	1,20	0,13
AMR	1,96	1,76	2,02	1,54	1,60	1,60	1,75	0,20
APP	1,91	1,53	2,26	1,62	1,67	1,75	1,79	0,26
APD	2,13	1,67	2,14	1,68	1,78	1,92	1,89	0,21
AEM	2,06	1,58	1,80	1,79	1,82	1,93	1,83	0,16
GDR	178,45	160,60	159,04	170,56	165,62	167,46	166,95	7,07
GDL	176,57	174,24	168,08	178,78	175,28	172,92	174,31	3,66
GDT	83,03	81,82	83,40	82,20	88,57	82,57	83,60	2,50
GDE	168,93	157,12	164,70	172,63	168,19	167,81	166,56	5,28

Casos de la serie J, sin tratamiento celular y un tiempo de 12 semanas

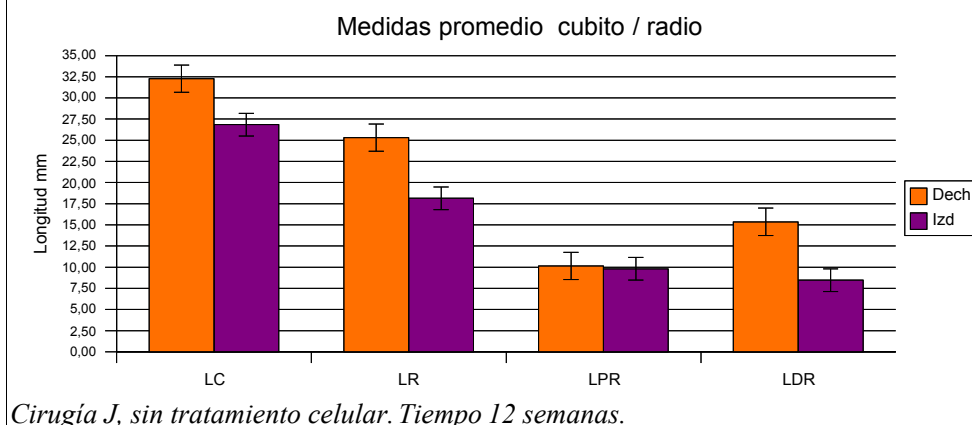
Tabla 5.5.73: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades.

Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
JC.2.1	33,00	28,98	25,95	21,11	10,00	12,64	16,14	8,79
JC.2.2	32,92	28,34	26,07	19,89	12,00	9,15	14,39	10,77
JC.2.3	33,21	25,61	25,94	16,12	11,00	10,54	15,45	5,74
JC.2.4	31,32	26,29	24,82	17,55	8,44	9,58	16,24	8,05
JC.2.5	31,66	25,79	23,95	16,50	9,27	8,20	14,86	8,39
JC.2.6	31,53	26,06	25,16	17,67	10,16	8,68	15,09	9,05
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	10,67	t cal =	10,64	t cal =	0,43	t cal =	8,15

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.73), de las longitudes del cúbito (LC), radio (LR), eje proximal (LPR) y distal del radio (LDR), muestra diferencias significativas acusadas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la longitud del cúbito, radio y longitud del eje distal del radio entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Ilustración 5.5.41: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.41) se indican las medidas promedio de las longitudes de cúbito, radio, eje proximal y eje distal de radio para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). En este caso como en los anteriores el eje proximal del radio (LPR) es mayor que el eje distal (LDR), en la extremidad intervenida, al contrario de lo que sucede en el control.

Tabla 5.5.74: Medidas comparativas de las longitudes de la fisis radial en la zona interior, media y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
JC.2.1	0,19	0,53	0,1	0,15	0,19	0,10
JC.2.2	0,38	0,07	0,19	0,07	0,14	0,05
JC.2.3	0,22	0,33	0,20	0,36	0,19	0,38
JC.2.4	0,21	0,16	0,16	0,42	0,36	0,16
JC.2.5	0,19	0,07	0,18	0,09	0,28	0,10
JC.2.6	0,18	0,18	0,18	0,14	0,41	0,09
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	0,08	t cal =	0,58	t cal =	1,61

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la placa en las tres secciones medidas, (Tabla 5.5.74) interior (LPI), media (LPM) y exterior (LPE) no indica diferencias significativas entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Resultados

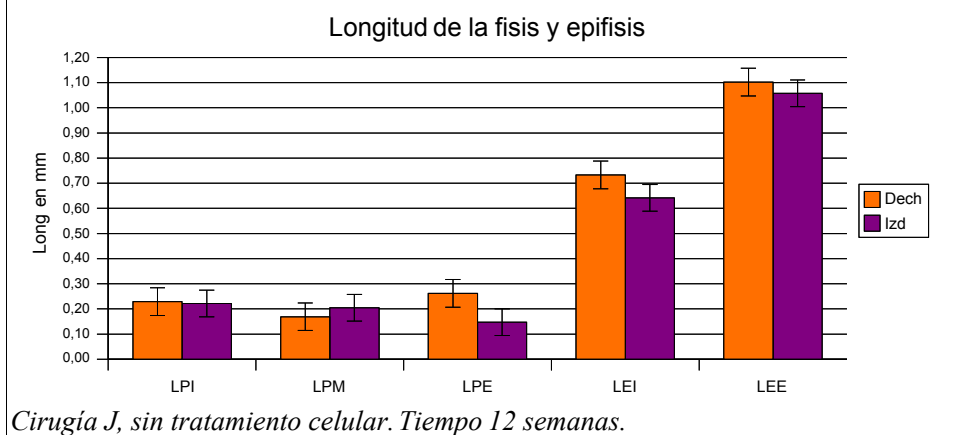
Tabla 5.5.75: Medidas comparativas de las longitudes de la epífisis en la zona interior y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long epifisis int LEI		Long epifisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
JC.2.1	0,88	0,69	1,30	1,35
JC.2.2	0,88	0,09	1,07	0,10
JC.2.3	0,64	1,03	0,95	1,59
JC.2.4	0,69	0,44	0,93	0,97
JC.2.5	0,61	1,19	1,07	1,47
JC.2.6	0,69	0,41	1,30	0,87
	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	0,45	t cal =	0,19

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la epífisis, (Tabla 5.5.75) interior (LEI) y exterior (LEE) no refleja diferencias significativas entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Ilustración 5.5.42: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 12 semanas.

En el gráfico (Ilustración 5.5.42) se indican las medidas promedio de las longitudes de la fisis en sus tres secciones medidas y epífisis para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). En este caso las longitudes medidas son mayores en la extremidad control que en la intervenida, excepto en el caso de la longitud de la placa media que es ligeramente mayor en la extremidad intervenida.

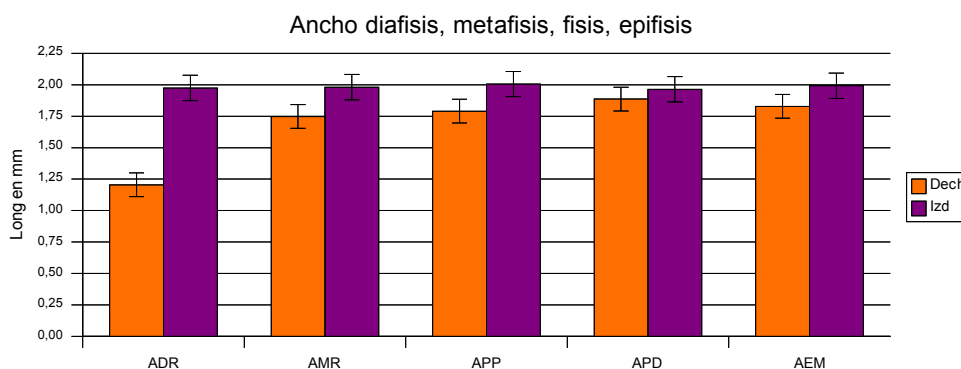
Tabla 5.5.76: Medidas comparativas de la anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMR		A placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
JC.2.1	1,15	2,02	1,96	1,83	1,91	2,01	2,13	1,75	2,06	1,78
JC.2.2	1,30	1,96	1,76	2,3	1,53	2,45	1,67	2,34	1,58	2,24
JC.2.3	1,39	1,12	2,02	1,4	2,26	1,81	2,14	1,75	1,80	1,65
JC.2.4	1,09	1,89	1,54	2,01	1,62	1,64	1,68	1,79	1,79	1,82
JC.2.5	1,06	1,87	1,60	2,42	1,67	2,05	1,78	1,91	1,82	2,14
JC.2.6	1,24	1,92	1,60	1,92	1,75	2,08	1,92	2,25	1,93	2,33
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 3,37		t cal = 1,09		t cal = 1,16		t cal = 0,46		t cal = 1,11	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de la anchura de la diáfisis, metáfisis fisis y epífisis (Tabla 5.5.76) muestra diferencias significativas acusadas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la anchura de la diáfisis radial entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Ilustración 5.5.43: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 12 semanas.

En el gráfico (Ilustración 5.5.43) se indican las medias promedio en anchura para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). Las medidas de anchura son mayores en la extremidad intervenida que en el control.

Resultados

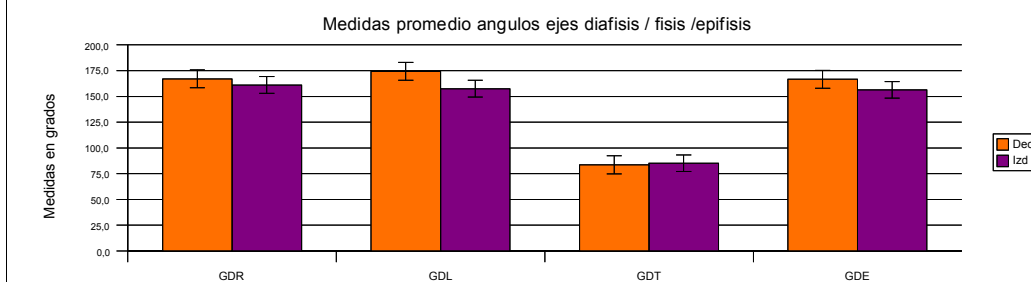
Tabla 5.5.77: Medidas comparativas de los ángulos de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.

Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
JC.2.1	178,4	158,4	176,6	173,2	83,0	117,4	168,9	136,8
JC.2.2	160,6	164,1	174,2	159,2	81,8	110,1	157,1	150,8
JC.2.3	159,0	136,8	168,1	133,4	83,4	70,8	164,7	164,2
JC.2.4	170,6	160,4	178,8	165,4	82,2	80,1	172,6	176,2
JC.2.5	165,6	173,6	175,3	148,5	88,6	60,0	168,2	142,0
JC.2.6	167,5	173,3	172,9	164,9	82,6	72,2	167,8	167,5
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 1,07		t cal = 3,52		t cal = 0,15		t cal = 1,68	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm

El análisis estadístico comparativo de los ángulos de los ejes diáfisis/placa y diáfisis/epífisis, (Tabla 5.5.77) muestra diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la ángulo diáfisis / eje longitudinal de la placa entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Ilustración 5.5.44: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía J, sin tratamiento celular. Tiempo 12 semanas.

En el gráfico de la ilustración 5.5.44, se muestran las medidas angulares promedio de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis para ambas extremidades.

5.5.5 Serie J15. Con MSC

Esta serie se corresponde con animales a los que se les realizó el trasplante de la fisis radial injertando la placa con su anillo pericondral y un resto de hueso metafisario y recibieron tratamiento sistémico con células MSC a los 15 días de realizado el trasplante.

Las valoraciones se han realizado a los dos tiempos de 6 y 12 semanas post-intervención.

Grupo J15. Tiempo 6 semanas

Caso J15.1.1 Radiológicamente se observa una extremidad sin desviaciones. La fisis radial está en posición ligeramente “minus” con respecto a la fisis cubital. Las corticales internas de cúbito y radio en su tercio distal aparecen alteradas, el cúbito y radio en esta zona han impactado dando una imagen de fusión ósea. La metáfisis radial está alterada dando una imagen de radio-transparencia que induce a pensar en deficiente osificación. (Fig 5.5.52)

Caso J15.1.2 Radiológicamente se observa una extremidad con una ligera desviación radial. La fisis radial está en posición muy “minus” con respecto a la fisis cubital. Hay alteraciones en metáfisis y epífisis. Hay una zona radio-condensante en la metáfisis que es irregular, no dibuja bien la diáfisis, con un estrechamiento de la diáfisis en el tercio medio. Separación radio cubital en el tercio distal. (Fig 5.5.53)

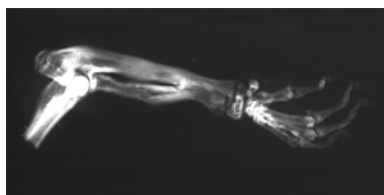


Fig 5.5.52. Caso J15.1.1

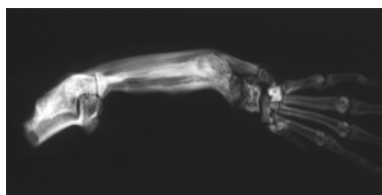


Fig 5.5.53. J15.1.2

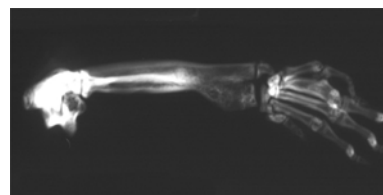


Fig 5.5.54. J15.1.3

Caso J15.1.3 Radiológicamente se observa una extremidad sin desviaciones. La fisis radial está en posición muy “minus” con respecto a la fisis cubital. Hay alteraciones en la metáfisis que produce un estrechamiento en la diáfisis. La metáfisis radial está alterada alternando imágenes condensantes con radio transparente, de alteraciones en la osificación. (Fig 5.5.54)

Caso J15.1.4 Radiológicamente se observa una extremidad con una marcada desviación radial con un incurvamiento del cúbito en el tercio distal. La fisis radial está en posición “minus” con respecto a la fisis cubital. La zona radio-transparente que correspondería a la placa es irregular. La epífisis ha perdido su forma trapezoidal y aparece como una forma rectangular muy estrecha. Hay alteraciones en la metáfisis, da una imagen de radio-transparencia con puntos opacos. (Fig 5.5.55)

Resultados

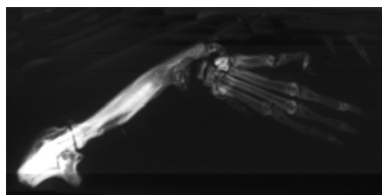


Fig 5.5.55. Caso J15.1.4

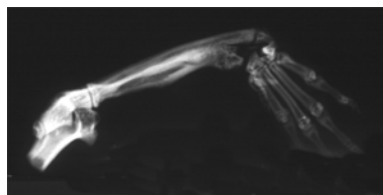


Fig 5.5.56. Caso J15.1.5

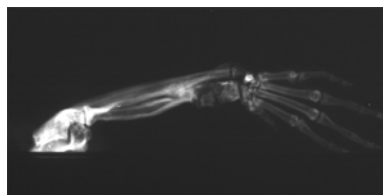


Fig 5.5.57. Caso J15.1.6

Caso J15.1.5 Radiológicamente se observa una extremidad con una marcada desviación radial con un incurvamiento del cúbito en el tercio distal. La fisis radial está en posición muy “minus” con respecto a la fisis cubital. Hay un acortamiento de la extremidad. La epífisis está alterada, en la metáfisis al contrario de los casos anteriores se observa una imagen muy radio-condensante. (Fig 5.5.56)

Caso J15.1.6 Radiológicamente se observa en este caso una mano ligeramente desviada, con un incurvamiento del cúbito en el tercio distal. La fisis radial está en posición “minus” con respecto a la fisis cubital. Se aprecia un acortamiento de la extremidad superior en el radio intervenido. En región que correspondería a la placa de crecimiento se observa una imagen de radio-transparencia que forma una banda ancha de un lado a otro, sin poderse distinguir bien la separación con la zona metafisaria. En la zona metafisaria-diafisaria hay una zona radio-condensante con un estrechamiento que la separa parcialmente del resto del tejido medular de la metáfisis (Fig 5.5.57)

Tabla 5.5.78: Medidas de la articulación intervenida.

	J15.1.1 lzd.	J15.1.2 lzd.	J15.1.3 lzd.	J15.1.4 lzd.	J15.1.5 lzd.	J15.1.6 lzd.	Media	Desvest
LC	27,34	26,30	26,89	23,75	25,01	25,30	25,77	1,33
LR	19,94	17,15	18,49	14,77	15,62	18,00	17,33	1,90
LPR	8,98	12,34	11,11	7,25	7,91	8,09	9,28	2,01
LDR	10,92	5,21	7,61	6,01	7,05	9,78	7,76	2,20
LPI	0,20	0,31	0,29	1,06	1,39	0,27	0,59	0,51
LPM	0,18	0,28	0,19	1,34	0,64	0,40	0,50	0,44
LPE	0,12	0,84	0,14	1,35	1,62	0,50	0,76	0,62
LEI	0,92	1,52	1,24	0,35	0,53	0,80	0,89	0,44
LEE	1,76	1,81	1,41	0,50	0,61	1,96	1,34	0,64
ADR	1,87	2,58	1,43	1,62	2,03	1,24	1,79	0,48
AMR	2,29	2,30	2,00	2,49	2,11	2,27	2,24	0,17
APP	1,88	2,45	1,93	2,29	2,13	2,35	2,17	0,23
APD	1,83	2,38	1,97	1,49	2,00	2,18	1,97	0,30
AEM	2,07	2,16	1,95	1,49	1,55	2,09	1,88	0,29
GDR	175,04	145,91	166,38	159,43	156,10	170,03	162,15	10,53
GDL	169,71	164,60	149,64	139,04	150,29	152,83	154,35	11,10
GDT	77,39	98,98	108,52	55,49	60,45	68,07	78,15	21,38
GDE	173,38	170,71	154,24	141,72	146,94	159,24	157,70	12,65

Casos de la serie J, con tratamiento con MSC a los 15 días y un tiempo de 6 semanas.

Tabla 5.5.79: Medidas de la articulación control.

	J15.1.1	J15.1.2	J15.1.3	J15.1.4	J15.1.5	J15.1.6		
	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Media	Desvest
LC	31,40	29,94	29,44	29,56	29,22	29,51	29,84	0,80
LR	24,53	23,41	22,81	22,88	22,84	22,98	23,24	0,67
LPR	9,73	10,19	10,63	10,30	10,44	11,21	10,42	0,49
LDR	14,79	13,41	12,24	12,62	12,43	11,91	12,90	1,05
LPI	0,44	0,33	0,24	0,25	0,30	0,27	0,30	0,07
LPM	0,18	0,24	0,17	0,19	0,28	0,19	0,21	0,04
LPE	0,23	0,18	0,20	0,24	0,57	0,37	0,30	0,15
LEI	0,81	0,76	0,65	0,81	0,72	0,71	0,74	0,06
LEE	1,33	1,11	1,02	1,01	1,07	0,99	1,09	0,13
ADR	1,20	1,09	1,05	1,05	1,03	1,07	1,08	0,06
AMR	1,83	2,00	1,62	1,82	1,47	1,60	1,72	0,20
APP	1,82	1,94	1,54	1,91	1,62	1,65	1,75	0,17
APD	1,89	2,08	1,86	2,14	1,78	1,75	1,92	0,16
AEM	2,00	1,77	1,70	1,81	1,83	1,92	1,84	0,10
GDR	162,28	162,49	160,55	159,69	167,71	170,70	163,90	4,34
GDL	178,68	173,16	179,41	176,50	176,52	176,36	176,77	2,19
GDT	86,49	82,48	86,47	90,26	84,60	80,69	85,17	3,38
GDE	165,62	170,81	164,84	164,84	170,19	169,73	167,67	2,85

Casos de la serie J, con tratamiento con MSC a los 15 días y un tiempo de 6 semanas.

Tabla 5.5.80: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades.

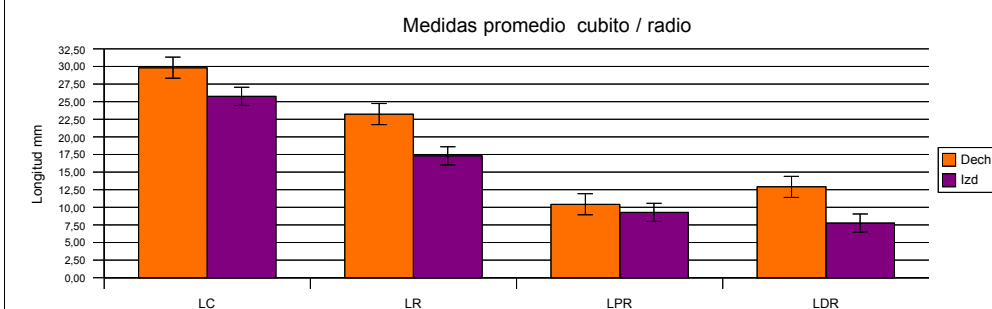
Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
J15.1.1	31,40	27,34	24,53	19,94	9,73	8,98	14,79	10,92
J15.1.2	29,94	26,30	23,41	17,15	10,19	12,34	13,41	5,21
J15.1.3	29,44	26,89	22,81	18,49	10,63	11,11	12,24	7,61
J15.1.4	29,56	23,75	22,88	14,77	10,30	7,25	12,62	6,01
J15.1.5	29,22	25,01	22,84	15,62	10,44	7,91	12,43	7,05
J15.1.6	29,51	25,30	22,98	18,00	11,21	8,09	11,91	9,78
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 9,45		t cal = 9,43		t cal = 1,3		t cal = 5,92	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.80), de las longitudes del cúbito (LC), radio (LR), eje proximal (LPR) y distal del radio (LDR), muestra diferencias significativas acusadas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la longitud del cúbito, radio y longitud del eje distal del radio entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Resultados

Ilustración 5.5.45: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días post-intervención. Tiempo 6 semanas.

En el gráfico 5.5.45 se indican las medidas promedio de las longitudes de cúbito, radio, eje proximal y eje distal de radio para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). En este caso como en los anteriores el eje proximal del radio (LPR) es mayor que el eje distal (LDR), en la extremidad intervenida, al contrario de lo que sucede en el control.

Tabla 5.5.81: Medidas comparativas de las longitudes de la fisis radial en la zona interior, media y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
J15.1.1	0,44	0,20	0,18	0,18	0,23	0,12
J15.1.2	0,33	0,31	0,24	0,28	0,18	0,84
J15.1.3	0,24	0,29	0,17	0,19	0,20	0,14
J15.1.4	0,25	1,06	0,19	1,34	0,24	1,35
J15.1.5	0,30	1,39	0,28	0,64	0,57	1,62
J15.1.6	0,27	0,27	0,19	0,40	0,37	0,50
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 1,29		t cal = 1,64		t cal = 2,08	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la placa en las tres secciones medidas, (Tabla 5.5.81) interior (LPI), media (LPM) y exterior (LPE) no indica diferencias significativas entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

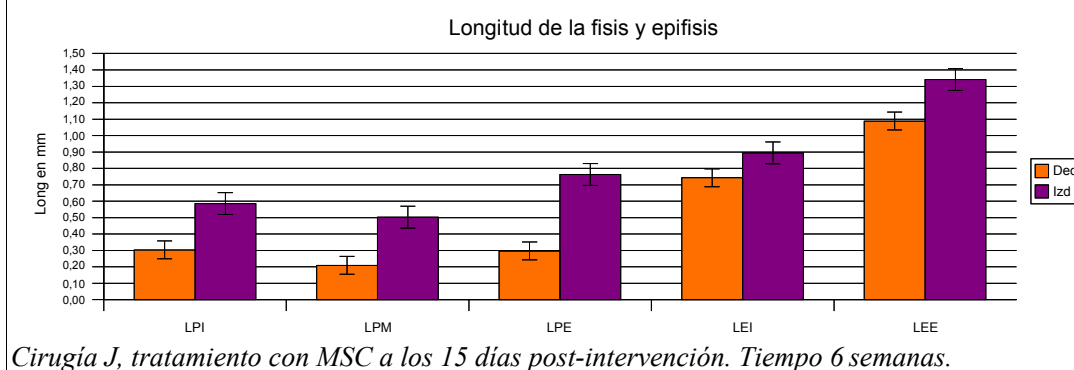
Tabla 5.5.82: Medidas comparativas de las longitudes de la epifisis radial en la zona interior y exterior de ambas extremidades.

Casos	Long epifisis int LEI		Long epifisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
J15.1.1	0,81	0,92	1,33	1,76
J15.1.2	0,76	1,52	1,11	1,81
J15.1.3	0,65	1,24	1,02	1,41
J15.1.4	0,81	0,35	1,01	0,50
J15.1.5	0,72	0,53	1,07	0,61
J15.1.6	0,71	0,80	0,99	1,96
	t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 0,80		t cal = 1,02	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo de las longitudes de la epífisis en las dos secciones medidas, (Tabla 5.5.82) interior (LEI), y exterior (LEE) no muestra diferencias significativas entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Ilustración 5.5.46: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.46) se indican las medidas promedio de las longitudes de la fisis en sus tres secciones medidas y epífisis para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). En este caso las longitudes medidas son mayores en todos los casos en la extremidad intervenida que en el control.

Tabla 5.5.83: Medidas comparativas de las medidas en anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades.

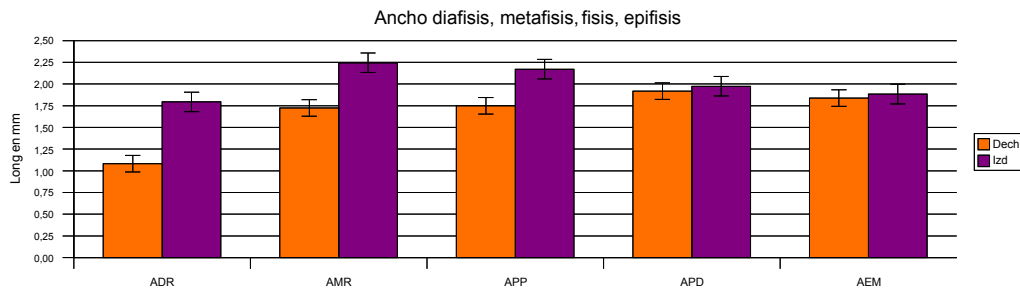
	A diáfisis ADR		A metáfisis AMRA placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM			
Casos	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
J15.1.1	1,20	1,87	1,83	2,29	1,82	1,88	1,89	1,83	2,00	2,07
J15.1.2	1,09	2,58	2,00	2,30	1,94	2,45	2,08	2,38	1,77	2,16
J15.1.3	1,05	1,43	1,62	2,00	1,54	1,93	1,86	1,97	1,70	1,95
J15.1.4	1,05	1,62	1,82	2,49	1,91	2,29	2,14	1,49	1,81	1,49
J15.1.5	1,03	2,03	1,47	2,11	1,62	2,13	1,78	2,00	1,83	1,55
J15.1.6	1,07	1,24	1,60	2,27	1,65	2,35	1,75	2,18	1,92	2,09
	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57	t tab =	2,57
	t cal =	3,67	t cal =	7,90	t cal =	4,89	t cal =	0,36	t cal =	0,38

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm

El análisis estadístico comparativo de la anchura de la diáfisis, metáfisis fisis y epífisis (Tabla 5.5.83) muestra diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la anchura de la diáfisis radial, metáfisis y fisis en su zona proximal entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Resultados

Ilustración 5.5.47: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días post-intervención. Tiempo 6 semanas.

En el gráfico (Ilustración 5.5.47) se indican las medidas promedio en anchura para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). Las medidas de anchura son mayores en la extremidad intervenida que en el control.

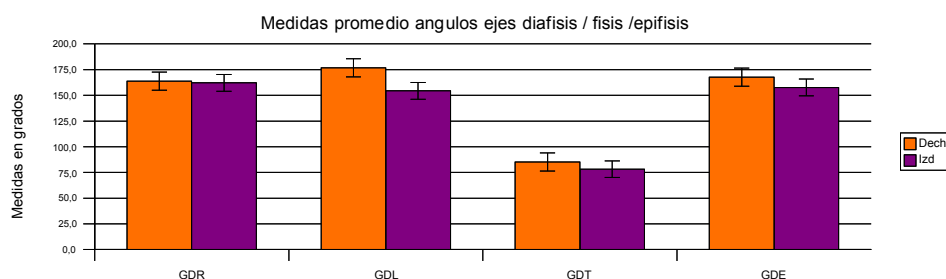
Tabla 5.5.84: Medidas en mm de los ángulos de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades

Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
J15.1.1	162,3	175,0	178,7	169,7	86,5	77,4	165,6	173,4
J15.1.2	162,5	145,9	173,2	164,6	82,5	99,0	170,8	170,7
J15.1.3	160,6	166,4	179,4	149,6	86,5	108,5	164,8	154,2
J15.1.4	159,7	159,4	176,5	139,0	90,3	55,5	164,8	141,7
J15.1.5	167,7	156,1	176,5	150,3	84,6	60,5	170,2	146,9
J15.1.6	170,7	170,0	176,4	152,8	80,7	68,1	169,7	159,2
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 0,40		t cal = 4,75		t cal = 0,77		t cal = 1,98	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 6 semanas.

El análisis estadístico comparativo de los ángulos de los ejes diáfisis/placa y diáfisis/epífisis, (Tabla 5.5.84) muestra diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la ángulo diáfisis / eje longitudinal de la placa entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Ilustración 5.5.48: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días post-intervención. Tiempo 6 semanas.

En el gráfico de la ilustración 5.5.48, se muestran las medidas angulares promedio de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %).

Grupo J15. Tiempo 12 semanas

Caso J15.2.1 Radiológicamente se observa una extremidad sin desviaciones. La fisis radial está en posición ligeramente “minus” con respecto a la fisis cubital. A nivel de la diáfisis se observa una alteración del cúbito y radio, el cúbito tienen un ensanchamiento que impacta en el radio. (Fig 5.5.58)

Caso J15.2.2 Radiológicamente se observa una extremidad sin desviaciones. La fisis radial está en posición ligeramente “minus” con respecto a la fisis cubital. A nivel de la metáfisis en la zona externa se observa una zona de radio-transparencia. En el tercio medio distal de la diáfisis hay un estrechamiento en la zona diáfisis-metáfisaria (Fig 5.5.59)

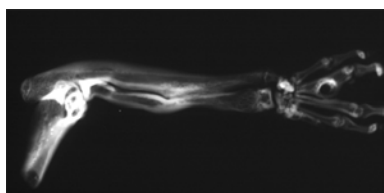


Fig 5.5.58. Caso J15.2.1

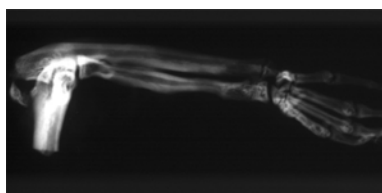


Fig 5.5.59. Caso J15.2.2

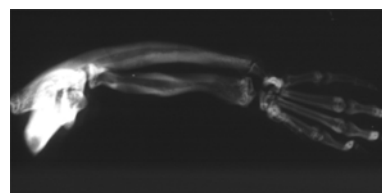


Fig 5.5.60. Caso J15.2.3

Caso J15.2.3 Radiológicamente se observa una extremidad con desviación radial, con un incurvamiento del cúbito en su mitad distal. La fisis radial está en posición “minus” con respecto a la fisis cubital. La zona radio-transparente que correspondería a la placa sólo ocupa la mitad interna de la anchura total, la placa en su zona externa ha desaparecido. La epífisis ha perdido su arquitectura normal y aparece como una forma irregular ocupando la zona externa de la articulación. Hay alteraciones en la metáfisis, se observa una imagen de radio-transparencia en la zona medular las corticales aparecen más marcadas, hay un estrechamiento marcado a nivel medio en la diáfisis radial. (Fig 5.5.60)

Caso J15.2.4 Radiológicamente se observa una extremidad sin desviación radial. La fisis radial está en posición discretamente “plus” con respecto a la fisis cubital. No hay acortamiento de la extremidad. La metáfisis dibuja bien la diáfisis, hay un estrechamiento de la diáfisis en su zona media. La imagen no presenta grandes alteraciones óseas, podríamos decir que tienen un patrón de normalidad. (Fig 5.5.61)

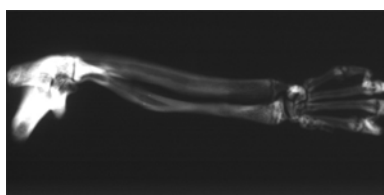


Fig 5.5.61. Caso J15.2.4

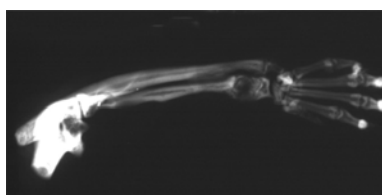


Fig 5.5.62. Caso J15.2.5

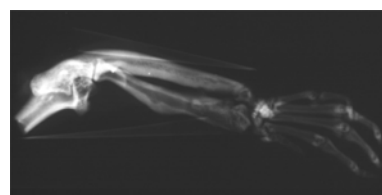


Fig 5.5.63. Caso J15.2.6

Resultados

Caso J15.2.5 Radiológicamente se observa en este caso una mano ligeramente desviada, con un incurvamiento del cúbito en el tercio distal. La fisis radial está en posición ligeramente “minus” con respecto a la fisis cubital. En la región que correspondería a la placa de crecimiento se observa una imagen de radio-transparencia que forma una banda estrecha de un lado a otro, Hay una zona más opaca en la separación con la zona metafisaria. La metáfisis aparece algo ensanchada y con poca condensación. En la zona meta-diafisaria hay una zona radio-condensante con un estrechamiento que la separa parcialmente del resto de la diáfisis que se observa más estrecha en esta zona (Fig 5.5.62)

Caso J15.2.6 Radiológicamente se observa una extremidad con ligera desviación radial. La fisis radial esta en posición “minus” con respecto a la fisis cubital. La zona radio-transparente que correspondería a la placa ocupa una banda estrecha de lado a lado. La epífisis ha perdido su arquitectura normal y aparece como una forma irregular. Hay alteraciones en el codo. (Fig 5.5.63)

Tabla 5.5.85: Medidas de la articulación intervenida.

	J15.2.1 lzd.	J15.2.2 lzd.	J15.2.3 lzd.	J15.2.4 lzd.	J15.2.5 lzd.	J15.2.6 lzd.	Media	Desvest
LC	29,90	28,59	27,80	28,27	26,84	22,39	27,30	2,61
LR	21,28	21,35	17,90	21,69	18,75	16,29	19,54	2,23
LPR	9,61	9,83	8,57	8,62	8,17	7,71	8,75	0,82
LDR	11,52	11,59	9,10	13,36	10,63	8,51	10,79	1,78
LPI	0,07	0,10	0,14	0,13	0,09	0,19	0,12	0,04
LPM	0,07	0,07	0,14	0,13	0,09	0,12	0,10	0,03
LPE	0,07	0,38	0,13	0,17	0,10	0,25	0,18	0,12
LEI	0,89	1,05	0,52	0,69	0,57	1,17	0,81	0,27
LEE	1,57	1,51	0,25	1,21	1,26	1,28	1,18	0,48
ADR	2,01	1,19	1,82	0,71	0,83	2,19	1,46	0,63
AMR	1,63	1,91	2,28	1,46	2,02	2,42	1,95	0,37
APP	1,54	1,76	1,00	1,54	1,75	2,29	1,65	0,42
APD	1,58	1,81	1,18	1,75	2,01	2,24	1,76	0,36
AEM	1,79	1,78	0,81	1,78	1,71	2,37	1,70	0,50
GDR	172,36	169,59	175,66	162,99	170,91	164,92	169,40	4,72
GDL	171,87	173,64	177,93	167,35	163,40	176,45	171,77	5,53
GDT	81,07	84,42	89,05	86,70	75,75	99,99	86,16	8,21
GDE	173,53	175,06	162,73	160,08	177,62	159,92	168,15	8,11

Casos de la serie J, con tratamiento con MSC a los 15 días y un tiempo de 12 semanas.

Tabla 5.5.86: Medidas de la articulación control.

	J15.2.1	J15.2.2	J15.2.3	J15.2.4	J15.2.5	J15.2.6		
	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Dech	Media	Desvest
LC	34,15	32,50	31,59	30,84	30,74	30,80	31,77	1,35
LR	26,40	24,96	25,49	24,49	23,97	23,99	24,88	0,94
LPR	11,78	11,13	10,31	9,39	9,29	9,56	10,24	1,03
LDR	15,14	14,16	15,45	15,21	15,00	14,50	14,91	0,48
LPI	0,23	0,20	0,23	0,25	0,26	0,17	0,22	0,04
LPM	0,29	0,10	0,23	0,34	0,26	0,25	0,24	0,08
LPE	0,18	0,28	0,23	0,33	0,40	0,21	0,27	0,08
LEI	0,81	0,79	0,77	0,63	0,65	0,71	0,72	0,07
LEE	1,09	1,11	1,15	0,97	0,95	0,96	1,04	0,09
ADR	1,36	1,29	1,18	0,96	0,94	1,12	1,14	0,17
AMR	1,80	1,54	1,50	1,46	1,77	1,66	1,62	0,15
APP	1,91	1,53	1,56	1,50	1,95	1,74	1,70	0,20
APD	1,89	1,50	1,82	1,71	1,89	1,79	1,77	0,15
AEM	1,72	1,56	1,82	1,72	1,86	1,69	1,73	0,11
GDR	158,31	164,20	165,14	165,93	163,12	165,92	163,77	2,88
GDL	179,39	179,85	178,89	172,40	177,73	175,43	177,28	2,87
GDT	82,95	81,88	82,22	90,09	82,05	86,08	84,21	3,28
GDE	161,61	163,13	168,88	173,62	165,39	170,79	167,24	4,65

Casos de la serie J, con tratamiento con MSC a los 15 días y un tiempo de 6 semanas.

Tabla 5.5.87: Medidas comparativas de las longitudes del cúbito, radio, eje proximal y distal del radio de ambas extremidades.

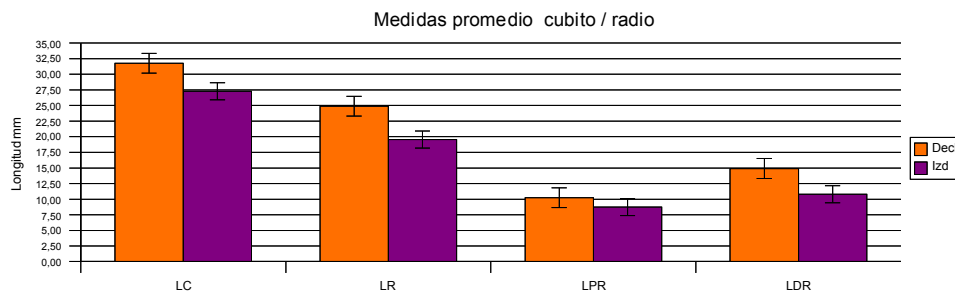
Casos	Long cubito LC		Long radio LR		Long prox rad LPR		Long dist radio LDR	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
J15.2.1	34,15	29,90	26,40	21,28	11,78	9,61	15,14	11,52
J15.2.2	32,50	28,59	24,96	21,35	11,13	9,83	14,16	11,59
J15.2.3	31,59	27,80	25,49	17,90	10,31	8,57	15,45	9,10
J15.2.4	30,84	28,27	24,49	21,69	9,39	8,62	15,21	13,36
J15.2.5	30,74	26,84	23,97	18,75	9,29	8,17	15,00	10,63
J15.2.6	30,80	22,39	23,99	16,29	9,56	7,71	14,50	8,51
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 5,44		t cal = 6,51		t cal = 7,00		t cal = 5,60	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.87), de las longitudes del cúbito (LC), radio (LR), eje proximal (LPR) y distal del radio (LDR), muestra diferencias significativas acusadas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la longitud del cúbito, radio y longitud del eje distal y proximal del radio entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Resultados

Ilustración 5.5.49: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días post-intervención. Tiempo 12 semanas.

En el gráfico (Ilustración 5.5.49) se indican las medidas promedio de las longitudes de cúbito y radio para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). las longitudes de cúbito y radio son mayores en la extremidad control que en la extremidad intervenida.

Tabla 5.5.88: Medidas comparativas de las longitudes de la placa radial en la zonas interna, media y externa de ambas extremidades.

Casos	Long placa Int LPI		Long plac med LPM		Long placa ext LPE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
J15.2.1	0,23	0,07	0,29	0,07	0,18	0,07
J15.2.2	0,20	0,10	0,10	0,07	0,28	0,38
J15.2.3	0,23	0,14	0,23	0,14	0,23	0,13
J15.2.4	0,25	0,13	0,34	0,13	0,33	0,17
J15.2.5	0,26	0,09	0,26	0,09	0,40	0,10
J15.2.6	0,17	0,19	0,25	0,12	0,21	0,25
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 3,77		t cal = 4,69		t cal = 1,49	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm.

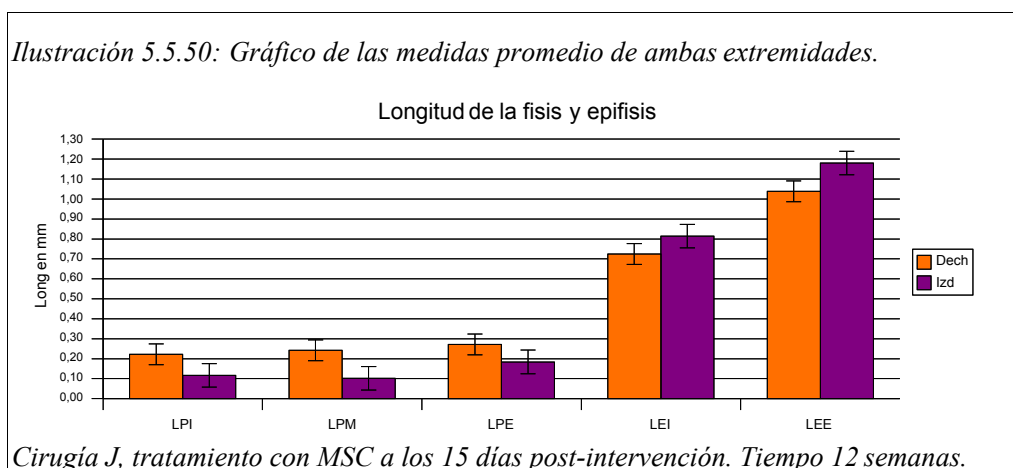
El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.88), de las longitudes de la placa en las tres zonas medidas, muestra diferencias significativas ($t_{cal} > t_{tab}$) en la longitud de la placa en la zona interna y media entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Tabla 5.5.89: Medidas comparativas de las longitudes de la epífisis en la zonas interna y externa de ambas extremidades

Casos	Long epifisis int LEI		Long epifisis ext LEE	
	Dech	Izd	Dech	Izd
J15.2.1	0,81	0,89	1,09	1,57
J15.2.2	0,79	1,05	1,11	1,51
J15.2.3	0,77	0,52	1,15	0,25
J15.2.4	0,63	0,69	0,97	1,21
J15.2.5	0,65	0,57	0,95	1,26
J15.2.6	0,71	1,17	0,96	1,28
	t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 0,86		t cal = 0,66	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.89), de las longitudes de la epífisis en las dos zonas medidas, no muestra diferencias significativas entre la extremidad intervenida y la extremidad control.



En el gráfico (Ilustración 5.5.50) se indican las medidas promedio de las longitudes de la fisis y epífisis para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). Las longitudes de la placa son mayores en la extremidad control que en la extremidad intervenida, por el contrario la longitud de la epífisis es mayor en la extremidad intervenida

Tabla 5.5.90: Medidas comparativas de las medidas en anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades

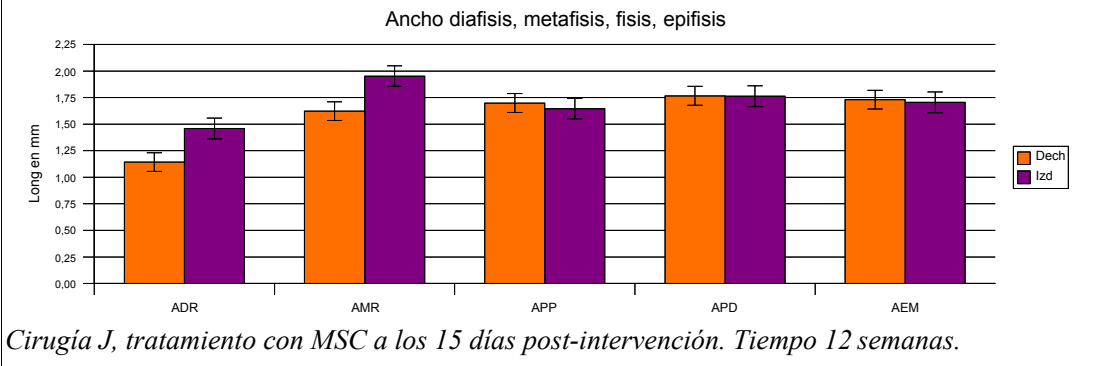
Casos	A diáfisis ADR		A metáfisis AMRA		placa prox APP		A placa dist APD		A epífisis AEM	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
J15.2.1	1,36	2,01	1,80	1,63	1,91	1,54	1,89	1,58	1,72	1,79
J15.2.2	1,29	1,19	1,54	1,91	1,53	1,76	1,50	1,81	1,56	1,78
J15.2.3	1,18	1,82	1,50	2,28	1,56	1,00	1,82	1,18	1,82	0,81
J15.2.4	0,96	0,71	1,46	1,46	1,50	1,54	1,71	1,75	1,72	1,78
J15.2.5	0,94	0,83	1,77	2,02	1,95	1,75	1,89	2,01	1,86	1,71
J15.2.6	1,12	2,19	1,66	2,42	1,74	2,29	1,79	2,24	1,69	2,37
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 1,43		t cal = 2,08		t cal = 0,32		t cal = 0,02		t cal = 0,11	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 6 semanas. Medidas reales en mm.

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.90), de las medidas en anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis, no muestra diferencias significativas entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Resultados

Ilustración 5.5.51: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.51) se indican las medidas promedio de las anchuras para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). La anchura de la diáfisis y metáfisis es mayor en la extremidad intervenida, la anchura la fisis y epífisis son prácticamente iguales.

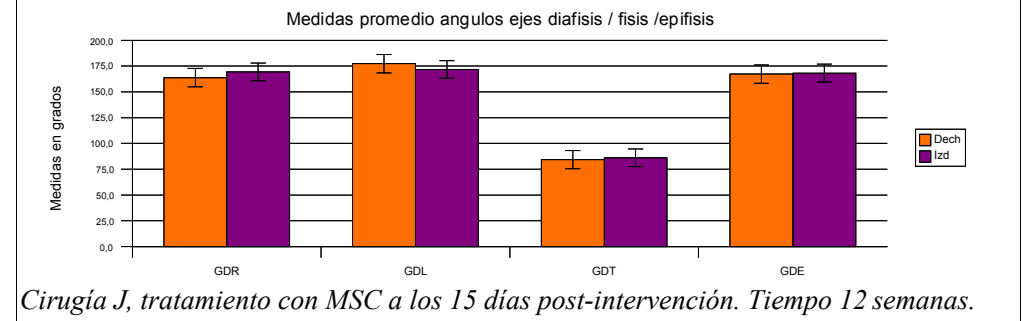
Tabla 5.5.91: Medidas comparativas de los ángulos de los ejes de la diáfisis, fisis y epífisis de ambas extremidades

Casos	A diaf/radio GDR		A diaf/placa GLD		A diaf/placa GDT		A dia/epif GDE	
	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd	Dech	Izd
J15.2.1	158,3	172,4	179,4	171,9	82,9	81,1	161,6	173,5
J15.2.2	164,2	169,6	179,9	173,6	81,9	84,4	163,1	175,1
J15.2.3	165,1	175,7	178,9	177,9	82,2	89,1	168,9	162,7
J15.2.4	165,9	163,0	172,4	167,3	90,1	86,7	173,6	160,1
J15.2.5	163,1	170,9	177,7	163,4	82,0	75,8	165,4	177,6
J15.2.6	165,9	164,9	175,4	176,5	86,1	100,0	170,8	159,9
	t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57		t tab = 2,57	
	t cal = 2,10		t cal = 2,50		t cal = 0,64		t cal = 0,18	

Análisis estadístico mediante prueba t de Student. Cirugía J, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante. Tiempo 12 semanas. Medidas en mm

El análisis estadístico comparativo (Tabla 5.5.91), de las medidas angulares no muestra diferencias significativas entre la extremidad intervenida y la extremidad control.

Ilustración 5.5.52: Gráfico de las medidas promedio de ambas extremidades.



En el gráfico (Ilustración 5.5.52) se indican las medidas promedio de los ángulos de la diáfisis / fisis / epífisis para ambas extremidades (porcentaje de error del 5 %). Las medidas angulares son muy similares en ambas extremidades.

5.5.6 Resumen del estudio radiológico

Resumen de los resultados obtenidos en la valoración cuantitativa de la articulación intervenida para los dos tipos de cirugía realizada, y las diferentes pautas de tratamiento con células MSCs.

Tabla 5.5.92: Resumen del nivel de significación de las diferencias con los respectivos controles encontradas para los grupos de la serie E y J a los distintos tiempos de evaluación

		EC.1	EC.2	EC.3	E0.1	E0.2	E0.3	E15.1	E15.2	E15.3	JC.1	JC.2	J15.1	J15.2
Longitud del cúbito	LC	++	+	++	++	+++	-	-	+++	++	++	+++	+++	++
Longitud del radio	LR	++	+	+	+++	+++	-	-	+++	+++	++	+++	+++	++
Longitud eje proximal	LPR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
Longitud eje distal	LDR	+++	+	+	++	+	++	++	+++	+	++	+++	++	++
Longitud placa Int.	LPI	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
Longitud placa med.	LPM	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
Longitud placa ext.	LPE	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Longitud epífisis int.	LEI	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Longitud epífisis ext.	LEE	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Ancho diáfisis radio	ADR	++	-	+	-	-	+++	-	+++	-	++	+	+	-
Ancho metáfisis	AMR	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	-
Ancho placa proximal	APP	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Ancho placa distal	APD	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ancho epífisis	AEM	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Angulo diáfisis radio	GDR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ang. radio/eje placa	GDL	-	+	-	-	++	-	-	++	-	-	+	+	-
Ang. radio/eje placa	GDT	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
Ang. radio/eje epífisi	GDE	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

igual menor mayor

En color si la extremidad intervenida es igual menor o mayor que el control.

- - no hay diferencias significativas con los controles
 - + la diferencia es moderada, menor del doble de t tab
 - ++ diferencia acusada, mayor del doble de t tab
 - +++ diferencias muy acusadas, mayor del triple de t tab
- Las longitudes de cúbito y radio son menores en la extremidad intervenida con distintos niveles de significación.
 - La longitud del eje proximal del radio no tiene diferencias significativas con el control y el eje distal es menor excepto en la cirugía J para la valoración a las 6 semanas.

Resultados

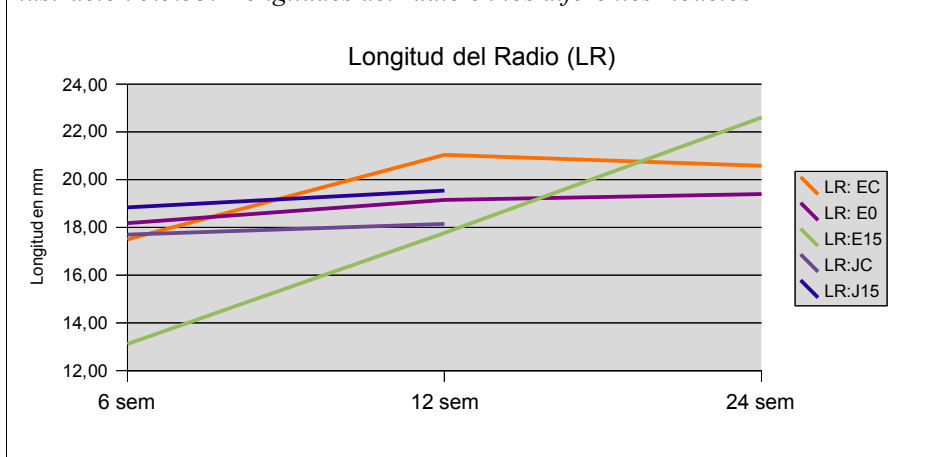
- La longitud de la fisis radial es mayor en la extremidad intervenida en los trasplantes con tratamiento celular. Estas diferencias son más evidentes en la valoración a las 12 semanas, mostrando diferencias significativas para E0.2 y E15.2 en las 3 zonas medidas.
- La anchura de la diáfisis, metáfisis, fisis y epífisis son mayores en la extremidad intervenida con distintos niveles de significación.
- Los ángulos de la diáfisis con la mano no muestran diferencias significativas, las medidas son prácticamente iguales excepto en los casos E0.2 y E15.2

Tabla 5.5.93: longitudes promedio del radio en mm en la extremidad intervenida

	LR: EC	LR: E0	LR:E15	LR:JC	LR:J15
6 sem	17,49	18,17	13,11	17,70	18,84
12 sem	21,03	19,16	17,77	18,14	19,54
24 sem	20,58	19,39	22,60		

En la tabla 5.5.93 se muestran las longitudes medias alcanzadas por el radio a los tres tiempos de valoración estudiados; sin tratamiento celular (EC y JC) con células MSCs administradas en el momento de la intervención (E0) y con células MSC a los 15 días de la intervención (E15 y J15)

Ilustración 5.5.53: Longitudes del radio en los diferentes modelos



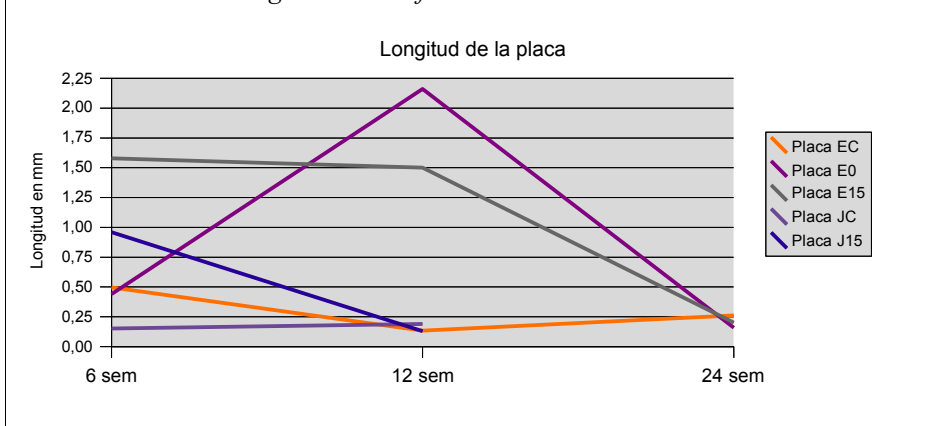
En el gráfico 5.5.53 se analizan las longitudes promedio alcanzadas por el radio. El crecimiento mayor se alcanza con el modelo de tratamiento E15.

Tabla 5.5.94: Longitud promedio de la fisis radial en mm en los modelos de tratamiento

	Placa EC	Placa E0	Placa E15	Placa JC	Placa J15
6 sem	0,50	0,44	1,58	0,15	0,96
12 sem	0,13	2,16	1,50	0,19	0,13
24 sem	0,26	0,16	0,20		

En la tabla 5.5.94 se muestran las longitudes medias alcanzadas por la fisis radial con los diferentes modelos de tratamiento a los 3 tiempos valorados.

Ilustración 5.5.54: Longitudes de la fisis intervenida



En el gráfico 5.5.54 se analizan las longitudes promedio alcanzadas por la fisis injertada. Hay que destacar el crecimiento anormal de la placa observado en el grupo de ensayos E0.2

5 Resultados

5.6 Resultados estudio histológico

Se han valorado en cada caso, la estructura de la placa, la columnación, la celularidad, la matriz extracelular, el anillo pericondral, la unión de la placa con la epífisis y con la metáfisis la formación de osificaciones anormales y la respuesta inflamatoria del huésped, de acuerdo con la tabla de cuantificación indicada en métodos.

De acuerdo con la puntuación obtenida se obtiene una clasificación de respuesta y una clasificación promedio para el grupo estudiado.

Los resultados de agrupan por método quirúrgico, series y grupos.

- Método quirúrgico E. trasplante de fisis sola
- Método quirúrgico J . trasplante de fisis con resto de metáfisis
 - Serie EC. Sin tratamiento celular
 - Serie E0. Células MSC en el momento del trasplante
 - Serie E15. Células MSC a los 15 días del trasplante
 - Serie JC. Sin tratamiento celular
 - Serie J15. Células MSC a los 15 días del trasplante

5.6.1 Serie EC sin terapia celular

Corresponde a animales con trasplante de la placa radial distal sola, y que no recibieron tratamiento celular. La serie se dividió en 3 grupos, valorando la placa 6, 12 y 24 semanas post-trasplante.

Grupo EC. Tiempo 6 semanas

Caso: EC.1.1 (06-056) En el corte analizado, se observa que hay una disociación entre el crecimiento en anchura de la metáfisis y la placa, esta sólo ocupa un 50 %. (Fig

Resultados

5.6.1). Hay una reabsorción del injerto fundamentalmente en la zona central, observándose sin embargo en los márgenes de la placa la falta de una estructura clara de anillo pericondral.

En la zona de intervención existe una discontinuidad entre la epífisis y el hueso metafiso-diafisario, estando la zona que debería ocupar la placa ocupada por un tejido fibroconjuntivo denso poco vascularizado (Fig 5.6.1). En los márgenes de la placa se observa la falta de una estructura clara de anillo pericondral.

Caso: EC.1.2 (06-054) En la médula ósea existe un patrón infiltrativo de polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas. En este caso la placa si ha crecido en todo su espesor, hay un gran puente óseo central y necrosis parcial de la placa con puentes osteofibrosos. (Fig 5.6.2)

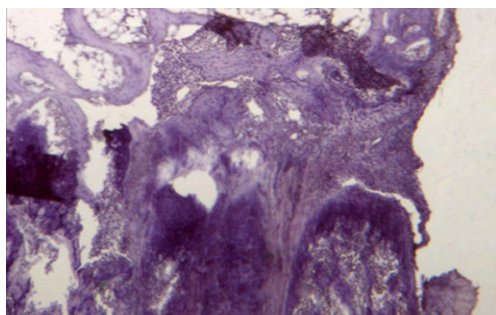


Fig 5.6.1. Caso EC.1.1 en zona de placa tejido fibroconjuntivo. 4X tinción HE

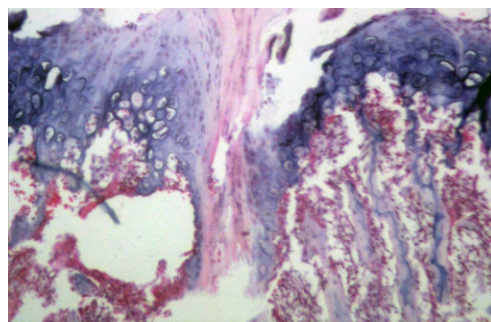


Fig 5.6.2. Caso EC.1.2 necrosis parcial y puentes osteofibrosos 10x tinción HE

Caso: EC.1.3 (06-060). En este caso se han observado áreas por encima de la placa en las que no había un patrón fibroso invasivo sino una arquitectura epifisaria compatible con la placa normal. En estas zonas se observa un crecimiento de la placa incluso superior al de una placa normal. La placa del cúbito en el mismo corte tiene una menor altura.

Caso: EC.1.4 (06-058) Se observa que la placa ha crecido en anchura. A ambos lados el anillo pericondral esta atrofiado. (Fig 5.6.3). La placa ha perdido su arquitectura normal, hay discontinuidad en la fisis con puentes osteofibrosos (Fig 5.6.4) y pérdida de zonas en diferentes regiones. En algunas zonas de la placa se aprecia la formación de trabéculas primarias y secundarias, pero muy escasas. En la zona metafisaria predomina la trabécula condral sobre la ósea (Fig 5.6.5). Predomina un patrón fibroso de respuesta, mas que un patrón infiltrativo. El injerto esta rodeado de un tejido fibroso poco vascularizado. En médula ósea hay un infiltrado celular abundante (Fig 5.6.5)

Casos EC.1.5 y EC.1.6 tienen una lectura similar al caso EC.1.4

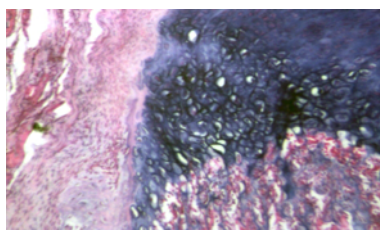


Fig 5.6.3. Caso EC.1.4 anillo y trabéculas 10x tinción HE

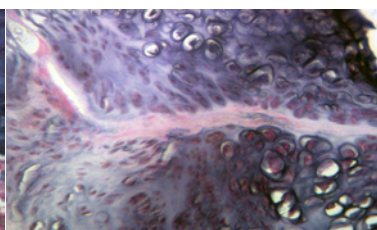


Fig 5.6.4. Caso EC.1.4 Puentes osteofibrosos 20x tinción HE

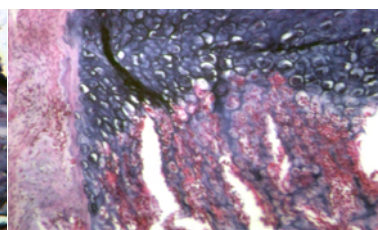


Fig 5.6.5. Caso EC.1.4 trabéculas condrales 10x tinción HE

Tabla 5.6.1. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía E, sin tratamiento celular, 6 semanas

Casos	Estruc.	Colum	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente.	Infilt.	IR
EC.1.1	9	6	5	3	2	2	2	4	1	34
EC.1.2	9	6	5	3	2	2	2	4	2	35
EC.1.3	6	4	6	3	2	0	2	1	1	25
EC.1.4	6	6	5	3	2	2	2	2	2	30
EC.1.5	9	6	6	3	2	2	2	2	2	34
EC.1.6	6	6	5	3	2	1	2	2	2	29
Sumas	45	34	32	18	12	9	12	15	10	187
IR promedio: 31,1 Clasificación: Alteración completa										

El índice de respuesta (IR) para cada caso nos lo da la suma de los valores obtenidos en cada parámetro. El índice de respuesta para el grupo sin tratamiento celular a las 6 semanas del trasplante indicado en la tabla 5.6.1 es de 31,1.

Hay una respuesta inflamatoria elevada, con abundantes osificaciones y pérdida de estructura y columnación en la mayor parte de la placa. El anillo se ha perdido en todos los casos y la unión con epífisis y metáfisis esta alterada excepto en un caso. Predomina la hiper celularidad en el proliferativo, germinativo e hipertrófico tienen hipocelularidad. En la valoración histológica global del grupo ha habido un fracaso en el trasplante.

Grupo EC. tiempo 12 semanas

Caso: EC.2.1 (06-616) Se observa que la placa ha crecido en toda su anchura. A ambos lados, el anillo pericondral está atrofiado. Se observa un gran puente osteofibroso central. La altura de la placa del radio mide 143,3 μ m y del cúbito 141,6 μ m

Caso: EC.2.2 (06-610) Se observa que la placa ha crecido en toda su anchura. El borde superior es normal, hay pérdida del anillo en ambos lados con un infiltrado de polimorfo-nucleares en los bordes. La estructura es discontinua, el germinativo es pobre con zonas casi sin células. Proliferativo con columnas irregulares e hipertrófico muy exuberante

Resultados

con células nucleadas. La placa del cúbito es irregular con una altura de 94,2 μm , la del radio mide 350 μm

Caso: EC.2.3 (06-612) Se observa que la placa ha crecido en toda su anchura y está a igual nivel que la del cúbito. La altura de la placa de crecimiento del radio mide 288 μm y la del cúbito 175 μm . Hay hipocelularidad en la zona germinativa (Fig 5.6.6 y 5.6.7)

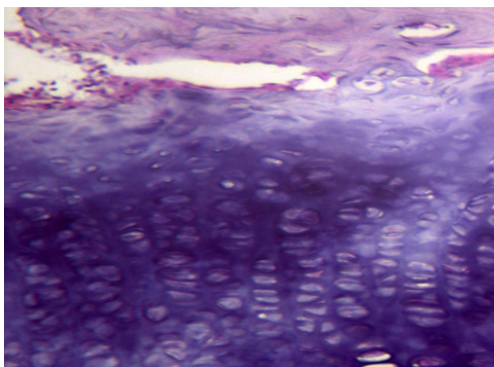


Fig 5.6.6.Caso EC.2.3 Crecimiento de la placa del radio 20x tinción HE

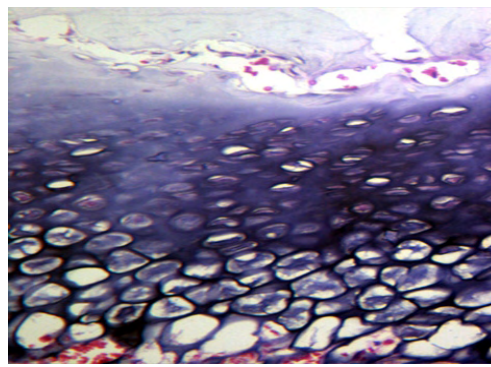


Fig 5.6.7.Caso EC.2.3 Crecimiento de la placa del cúbito 20x tinción HE

Caso: EC.2.4 (06-606) La placa ha crecido en anchura, es un caso similar al anterior. Altura de la placa de crecimiento del radio 388 μm y del cúbito 122 μm

Caso: EC.2.5 (06-603) En este caso no se observa patrón infiltrativo. Altura de la placa de crecimiento del radio mide 105 μm y del cúbito 143 μm

Caso: EC.2.6 (06-602) En este caso se observa que la placa del radio tiene una mitad normal y la otra mitad presenta un crecimiento exuberante en proliferativo e hipertrófico.

Tabla 5.6.2. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía E, sin tratamiento celular, 12 semanas

Casos	Estruc.	Column	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente	Infilt.	IR
EC.2.1	6	4	4	3	2	2	2	2	1	26
EC.2.2	3	2	4	2	2	0	2	2	2	19
EC.2.3	3	2	5	2	2	1	2	2	1	20
EC.2.4	3	2	4	2	2	0	2	1	1	17
EC.2.5	3	4	5	3	2	2	2	0	0	21
EC.2.6	6	4	4	3	2	1	2	0	1	23
Sumas	24	18	26	15	12	6	12	7	6	126
IR promedio:			21,0	Clasificación: Alteración intensa						

El índice de respuesta para el grupo sin tratamiento celular a las 12 semanas del

trasplante indicado en la tabla 5.6.2 es de 21,0. En este grupo la respuesta inflamatoria y osificaciones no son tan elevadas, en algún caso no se han observado. La placa conserva más su estructura y columnación. El anillo se ha perdido en todos los casos y la unión con metáfisis está alterada, en cambio la unión con la epífisis está mejor, con patrones de normalidad en 2 de los casos. Predomina la hipercelularidad en el proliferativo y sobre todo en hipertrófico, el germinativo sigue teniendo escasa celularidad. En la valoración global del grupo consideramos que histológicamente ha habido una reacción intensa pero no se ha alcanzado lo que podríamos considerar un fracaso en el trasplante.

Grupo EC. Tiempo 24 semanas

Caso: EC.3.1 (05-412) La placa ha crecido en toda su anchura. A ambos lados el anillo pericondral esta atrofiado. Se observa hipocelularidad en todas las zonas. Se observa un gran puente óseo central.

Caso: EC.3.2 (05-414) La placa ha crecido en toda su anchura y esta a igual nivel que la del cúbito. Es un caso similar al anterior. Esta rodeada de un gran infiltrado inflamatorio.

Caso: EC.3.3 (05-408) La placa ha crecido en toda su anchura. Hay pérdida del anillo en ambos lados con un infiltrado de polimorfo-nucleares en los bordes. La estructura es discontinua, tanto la zona germinativa como proliferativa son hipocelulares, el hipertrófico es hipercelular.

Caso: EC.3.4 (05-410) La placa ha crecido en anchura, es un caso similar al anterior.

Caso: EC.3.5 (06-413) En este caso no se observa patrón infiltrativo. Hay puentes óseos y fibrosos que recorren la placa.

Caso: EC.3.6 (06-415) La placa ha crecido, Hay pérdida del anillo, hipocelularidad en las 3 zonas y un puente óseo marginal.

Tabla 5.6.3. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía E, sin tratamiento celular, 24 semanas

Casos	Estruc.	Colum	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Osific.	Infilt.	IR
EC.3.1	2	2	6	2	2	1	2	2	1	20
EC.3.2	2	1	6	2	2	2	2	0	2	19
EC.3.3	4	2	3	2	2	1	2	1	1	18
EC.3.4	3	2	4	2	2	1	2	1	1	18
EC.3.5	3	2	5	3	2	2	2	2	0	21
EC.3.6	3	2	4	2	2	1	2	2	1	19
Sumas	17	11	28	13	12	8	12	8	6	115
IR promedio:			19,1	Clasificación: Alteración intensa						

Resultados

El índice de respuesta para el grupo sin tratamiento celular a las 24 semanas del trasplante indicado en la tabla 5.6.3 es de 19,1

En este grupo la respuesta inflamatoria y osificaciones no se observan en todos los casos. La placa conserva su estructura y columnación. El anillo se ha perdido en todos los casos y la unión con metáfisis esta alterada, con la epífisis la alteración es parcial. En general predomina la hipocelularidad en las 3 zonas. En la valoración global del grupo consideramos que histológicamente ha habido una alteración intensa.

5.6.2 Serie E0, tratamiento con MSCs

Animales con trasplante de la fisis radial distal sola, estimulados con células MSC en el momento del trasplante. La serie se dividió en 3 grupos, valorando la placa 6, 12 y 24 semanas post-trasplante.

Grupo E0. Tiempo 6 semanas

Caso: E0.1.1 (06-354) La placa esta rodeada de tejido fibroso, en la médula se observa un patrón infiltrativo de células. La placa tiene un crecimiento celular exuberante con pérdida de la arquitectura (Fig 5.6.8 y 5.6.9).

En el corte seriado realizado se observa el patrón de placa en zonas marginales y centrales, apareciendo zonas de discontinuidad tanto en región central como marginal. El anillo pericondral se ha perdido. Se observa una gran abundancia de células, en las zonas que se conservan de placa, tanto en germinativo como proliferativo e hipertrófico.

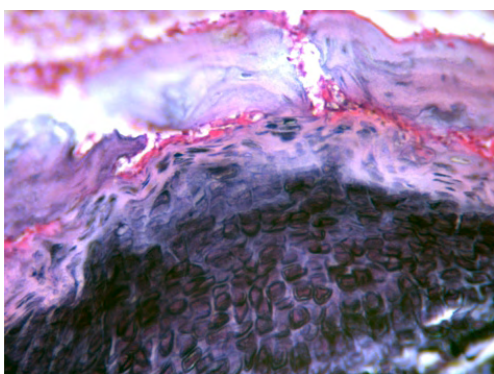


Fig 5.6.8.Caso E0.1.1 Zona epifisaria 20x tinción HE

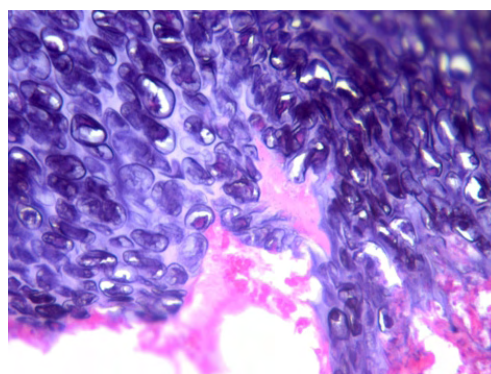


Fig 5.6.9.Caso E0.1.1 Zona metafisaria 20x tinción HE

Hay una banda de tejido fibroso en zona epifisaria (Fig 5.6.8) y en la zona metafisaria no hay trabéculas óseas y no forman apenas trabéculas condrales. Llama la atención que inmediatamente después del germinativo las células son globosas, con un núcleo grande y

llegan al borde de la metáfisis con esa estructura, sin aplanarse, ni perder el núcleo. (Fig 5.6.9)

Caso: E0.1.2 (06-363) El cartílago transplantado (Fig 5.6.11) ha crecido más que el cartílago control del cúbito (Fig 5.6.10). No hay discontinuidad en la placa, la arquitectura es normal, en la zona marginal externa hay una zona de fibrosis donde se ha perdido parte del germinativo y proliferativo pero no de hipertrófico (Fig 5.6.12). El anillo pericondral se ha perdido, hay una gran respuesta inflamatoria medular de polimorfos nucleares. Se han formado trabéculas osteocondrales pero no trabéculas óseas.

Altura de la placa de crecimiento radial 158 μ m, altura placa cubital 115 μ m

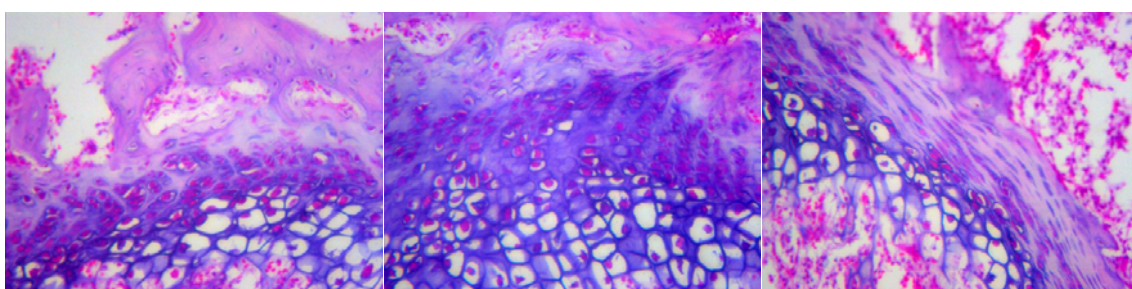


Fig 5.6.10.Caso E0.1.2 placa del cúbito 20x tinción HE

Fig 5.6.11.Caso E0.1.2 placa del radio 20x tinción HE

Fig 5.6.12.Caso E0.1.2 zona de fibrosis lateral 20x tinción HE

Caso: E0.1.3 (06-359) La placa es discontinua y ha perdido su estructura, esta rodeada de tejido fibroso con infiltración de granulocitos, polimorfonucleares, linfocitos. (Fig 5.6.13)

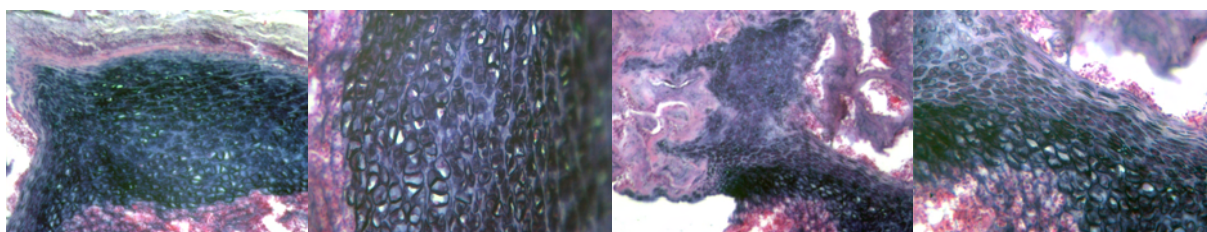


Fig 5.6.13.Caso E0.1.3 placa del radio 10x tinción HE

Fig 5.6.14.Caso E0.1.3 proliferativo zona lateral 20x tinción HE

Fig 5.6.15.Caso E0.1.3 condrocitos 10x tinción HE

Fig 5.6.16.Caso E0.1.3 Condrocitos en zona marginal 20x tinción HE

En las zonas que se conservan de placa se observa una gran abundancia de células, tanto en germinativo como proliferativo e hipertrófico, aunque debido a la pérdida de estructura es difícil definir cada zona. En la zona externa de la placa el eje mayor de los condrocitos se sitúa de forma paralela al hueso (Fig 5.6.14). Las células del hipertrófico son incompetentes para producir trabéculas óseas. En las figuras 5.6.15 y 5.6.16, se observa una formación extraña, la imagen refleja la presencia de condrocitos invadiendo otras estructuras próximas a la placa, parece como si el gran desarrollo celular de este caso, al perder la arquitectura normal que las contiene, las células migraran hacia lugares adyacentes.

Resultados

Caso: E0.1.4 (06-374) En este caso se observa un crecimiento aberrante en la zona externa de la placa. La placa conserva su arquitectura normal, ha crecido a lo ancho y ha acompañado en longitud a la placa condral del cúbito. En la zona interna tiene una estructura que recuerda el anillo pericondral, la arquitectura es normal, hay hiper celularidad en germinativo, el proliferativo es escaso y un hipertrófico muy desarrollado. Existe un infiltrado inflamatorio en zonas próximas a la placa y una disminución de las trabéculas óseas.

En uno de los extremos se aprecia una estructura digitiforme (Fig 5.6.17) que crece hacia la epífisis del radio y que tiene en la base de su crecimiento una estructura ósea tubular, que maldefine una estructura cortical. En la zona superior de este crecimiento digitiforme hay a modo de cúpula, un tejido cartilaginoso con núcleos redondos muy prominentes, donde algunas de estas masas de tejido condral con condrocitos tienden a aislarse de esta prolongación digitiforme. (Fig 5.6.18)

Altura de la placa cubital 158 μm , placa radial 343 μm , de las cuales el germinativo ocupa una altura de 50 μm , el proliferativo de 35 μm , y el resto es todo hipertrófico.

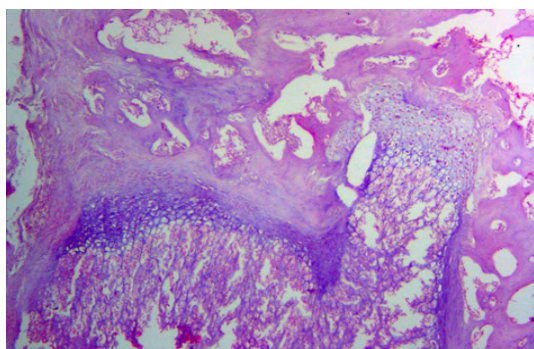


Fig 5.6.17. Caso E0.1.4 Placa radial 4x tinción HE

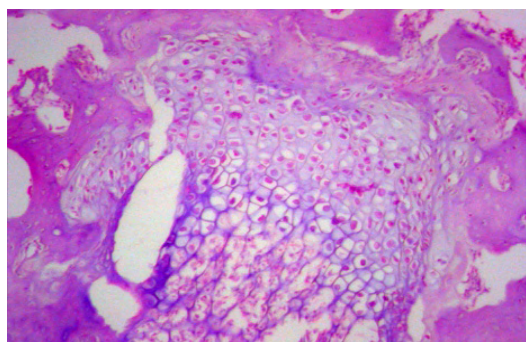


Fig 5.6.18. Caso E0.1.4 Detalle crecim. condral 10x tinción HE

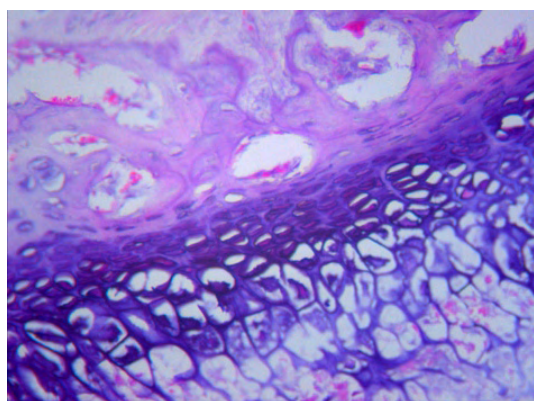


Fig 5.6.19. Caso E0.1.5 placa cubital 20x tinción HE

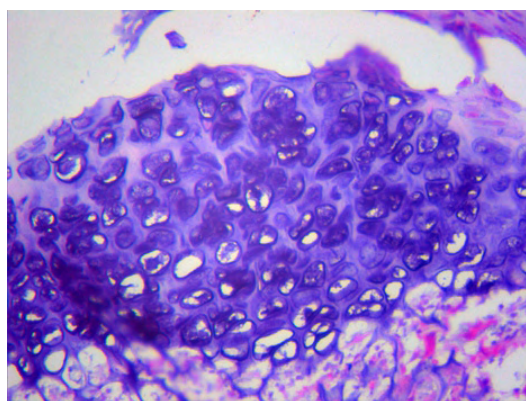


Fig 5.6.20. Caso E0.1.5 placa radial, 20x tinción HE

Caso: E0.1.5 (06-346) La respuesta del injerto es similar a la de los otros casos del grupo, aquí también se aprecia que la placa radial trasplantada (Fig 5.6.20) ha crecido más

que la placa cubital que la acompaña (Fig 5.6.19) y las células están más estimuladas.

Altura de la placa de crecimiento del cúbito 78 μ m, altura de la placa radial 176 μ m

Caso: E0.1.6 (06-366) Se repite el patrón de respuesta del grupo, mostrando una gran estimulación en la zona del germinativo. La placa conserva su arquitectura y ha crecido en anchura y esta a igual nivel de la placa cubital, las 3 estructuras están bien definidas y hay formación de hueso. Hay una mayor activación celular en germinativo y proliferativo. En este caso podemos decir que el trasplante ha funcionado aunque presenta un infiltrado de polimorfonucleares en médula.

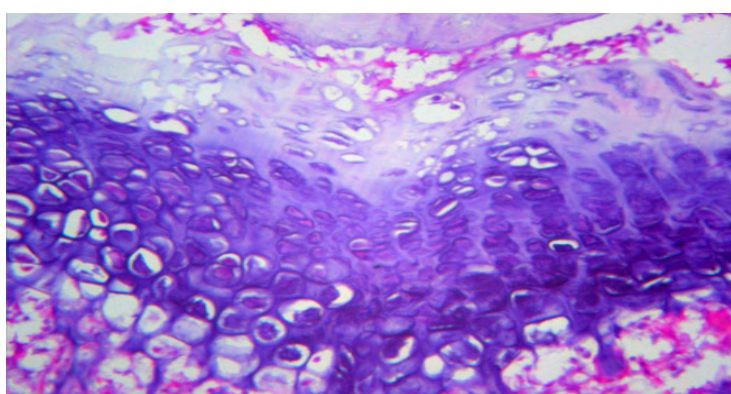


Fig 5.6.21. Caso E0.1.6 Placa de crecimiento radial, 20x tinción HE

Tabla 5.6.4. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía E, tratamiento con MSC, 6 semanas

Casos	Estruc.	Colum	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente	Infilt.	IR
E0.1.1	6	6	3	2	2	2	2	0	1	24
E0.1.2	0	2	3	2	2	0	0	0	1	10
E0.1.3	3	6	3	2	2	2	2	0	1	21
E0.1.4	0	2	2	1	1	1	1	0	1	9
E0.1.5	0	2	4	2	1	2	2	0	1	14
E0.1.6	0	0	2	1	2	0	0	0	1	6
Sumas	9	18	17	10	10	7	7	0	6	84
IR promedio: 14 Clasificación: Alteración intensa										

El índice de respuesta para el grupo con tratamiento con MSC a las 6 semanas del trasplante indicado en la tabla 5.6.4 es de 14. En este grupo encontramos una respuesta inflamatoria moderada, sin formación de puentes óseos en ninguno de los casos. Hay hiper celularidad en todos los casos. Con respecto a la estructura y columnación, hay discontinuidad en dos casos, el resto está dentro de la normalidad, en la interacción con epífisis y metáfisis también hay disparidad en las respuestas.

Resultados

En la valoración global del grupo los resultados son de reacción intensa en 3 casos pero en los otros 3 la reacción es discreta con patrones de normalidad en los parámetros medidos.

Grupo E0, Tiempo 12 semanas

Caso E0.2.1 (06-317) La placa ha crecido en anchura y se encuentra al mismo nivel que la del cúbito. Es una placa de crecimiento con una arquitectura normal, (Fig 5.6.22) se identifican bien todas las zonas, el borde epifisario tienen una arquitectura normal, el borde metafisario es normal con trabéculas primarias y secundarias (Fig 5.6.23). El anillo está a ambos lados y no hay infiltrado inflamatorio.

Altura de la placa de crecimiento del cúbito 187 μm , altura de la placa radial 222 μm

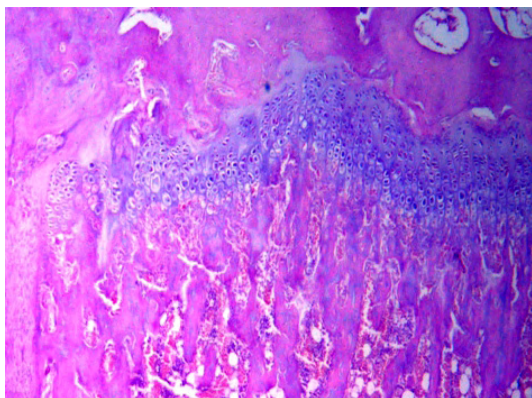


Fig 5.6.22.Caso E0.2.1 Fisis radial, lado ext. anillo pericondral 4x tinción HE

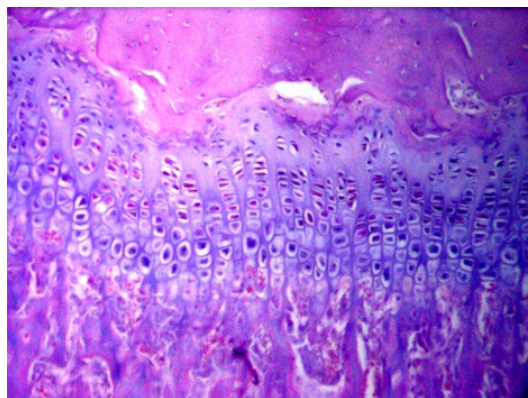


Fig 5.6.23.Caso E0.2.1 Fisis radial, 10x, tinción HE

Caso E0.2.2 (06-303) La placa tiene un crecimiento exuberante, esta rodeada de tejido fibroconjuntivo con un infiltrado de polimorfonucleares, plasmocitos y células gigantes. El anillo solo está presente en un lado y muy atrófico. la zona del germinativo está discretamente aumentada, el proliferativo es notable, pero sobre todo tiene un hipertrófico muy amplio.

Altura de la placa de crecimiento del cúbito 136 μm , placa radial 2.842 μm

Este caso por sus características especiales se valora de forma detallada en el apartado siguiente donde se indican además los patrones de crecimiento, denominados como A, B, C, D, y E, definidos para explicar los diferentes patrones de crecimiento encontrados en la placa radial trasplantada.

Caso E0.2.3 (06-316) La placa tiene un crecimiento muy exuberante, este crecimiento es mayor en zonas laterales que centrales, esta rodeada como en el caso anterior de tejido fibroconjuntivo con un infiltrado de polimorfonucleares, plasmocitos y células gigantes. Esta en una posición discretamente “minus” con respecto a la placa del cúbito.

Se identifican ambos huesos cúbito y radio. El cúbito con una placa de arquitectura normal, donde se identifican las 3 zonas germinativo, proliferativo e hipertrófico, con una arquitectura columnar bien respetada, se observa la presencia de células de mayor tamaño de lo normal en el borde epifisario.

La fisis radial tiene un patrón de crecimiento que hemos definido como patrón A en zonas laterales y patrón B en la zona central. No se observa la cortical externa del radio pero sí la cortical interna. La estructura condral de la placa presenta anomalías en su arquitectura, se observan las 3 regiones de la placa, la zona del germinativo esta muy aumentada, en algunas zonas se mantiene una arquitectura normal, el proliferativo tiene un discreto aumento, con columnación, pero n° de células variables. El hipertrófico es enorme, en las 5 ó 6 primeras capas se observa la presencia de células con núcleos normales, pero a partir de ahí. los núcleos son menos claros, más atípicos, estas células se van a prolongar hasta bien metidos en la diáfisis, pero no se observa la formación de trabécula óseas. ni condrales. En el borde epifisario de la placa se pierde la continuidad morfológica normal entre la placa y la epífisis, las células tienen aspecto fibroblástico, en esta zona abunda el tejido fibroso el hueso supra-placa pierde su configuración en el borde externo de la placa, aunque no se puede leer bien por defecto de corte

Altura de la placa de crecimiento del cúbito 150 μm , altura de la placa radial 1.562 μm

Caso E0.2.4 (06-315) La placa ha crecido en anchura y se encuentra al mismo nivel que la del cúbito. Es una placa de crecimiento con una arquitectura normal, (Fig 5.6.24 y 5.6.25) donde se identifican bien todas las zonas.

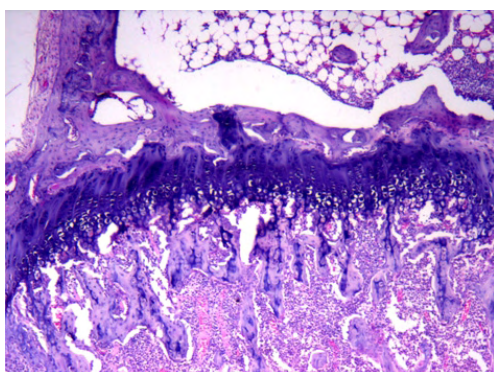


Fig 5.6.24. Caso E0.2.4 Placa de crecimiento del cúbito 4x, tinción HE

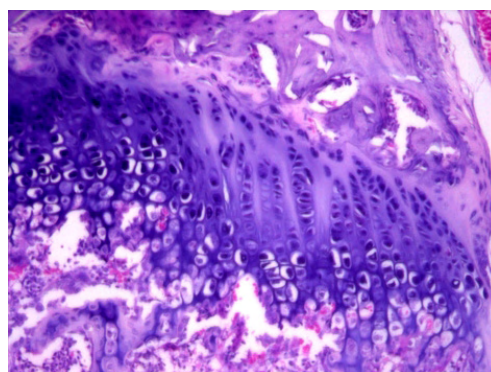


Fig 5.6.25. Caso E0.2.4 Placa de crecimiento radial 10x, tinción HE

Esta rodeada de un infiltrado inflamatorio y un tejido fibroconjuntivo mas discreto. Los anillos están atroficos, no hay trabeculas primarias y secundarias tiene muy pocas.

Altura de la placa del cúbito 195 μm , placa del radio 213 μm

Resultados

Caso E0.2.5 (06-310) La placa tiene un crecimiento exuberante, esta rodeada de tejido fibroconjuntivo con un infiltrado de polimorfonucleares, plasmocitos y células gigantes. La fisis radial tiene un patrón de crecimiento que hemos definido como patrón A . Es un caso semejante al E0.2.2 con la zona del germinativo aumentada, un proliferativo notable, pero sobre todo con un hipertrófico enorme.

Altura de la placa de crecimiento del cúbito 166 μm , altura placa del radio 3.200 μm

Caso E0.2.6 (06-309) La placa tiene un crecimiento exuberante, también esta rodeada de tejido fibroconjuntivo con un infiltrado inflamatorio. Es un caso semejante al anterior, algo más discreto en el crecimiento

Altura de la placa de crecimiento del cúbito 142 μm , altura placa del radio 1.542 μm

Tabla 5.6.5. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía E, tratamiento con MSC en trasplante, 12 sem.

Casos	Estruc.	Colum	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente	Infilt.	IR
E0.2.1	0	0	3	0	0	0	0	0	1	4
E0.2.2	0	0	2	1	2	2	2	0	1	10
E0.2.3	3	2	3	1	2	2	2	0	1	16
E0.2.4	0	0	1	1	2	0	2	0	1	7
E0.2.5	0	0	2	1	2	2	2	0	1	10
E0.2.6	0	0	3	1	2	2	2	0	1	11
Sumas	3	2	14	5	10	8	10	0	6	58
IR promedio:			9,6	Clasificación: Alteración discreta						

El índice de respuesta para el grupo con tratamiento con MSC a las 12 semanas del trasplante indicado en la tabla 5.6.5 es de 9,6, lo que clasifica al grupo como de reacción discreta, con 2 casos en los que la respuesta es normal.

En este grupo encontramos una respuesta inflamatoria moderada, no hay formación de puentes óseos. Hay hiper celularidad en el germinativo, el proliferativo de normal a discreto aumento de la celularidad, lo que caracteriza al grupo es el crecimiento tan extraordinario y exuberante del hipertrófico, encontrado en 4 de los casos. La estructura y columnación esta dentro de la normalidad

5.6.3 Análisis detallado del Grupo E0.2

En este grupo dado el hallazgo observado en un caso E0.2.2 (06-303), se realiza un descripción global de los resultados, con objeto de aclarar la terminología usada en la descripción de los ensayos.

Hemos establecido unos patrones de crecimiento para la placa con las denominaciones esquemáticas que indicamos y que detallamos a continuación.

- Patrón A: placa normal
- Patrón B: placa con estructura anormal y puentes óseos
- Patrón C: placa con condrocitos verticalizados
- Patrón D: placa con señales de displasia
- Patrón E: placa con señales anaplasia

A la arquitectura que se observa en una placa de crecimiento trasplantada con un patrón de crecimiento normal, se la ha denominado **Patrón A**. (Fig 5.6.26 y 5.6.27)



Fig 5.6.26. **Patrón A** 2x, tinción HE. Placa radial trasplantada con crecimiento normal

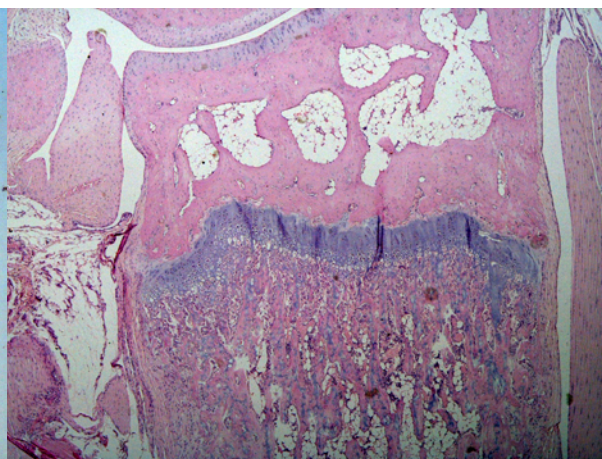


Fig 5.6.27. **Patrón A** 4x, tinción HE. Placa radial trasplantada con crecimiento normal

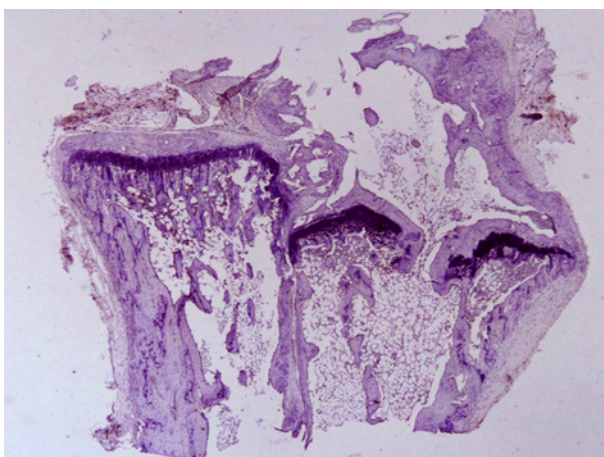


Fig 5.6.28. **Patrón B** 1x, tinción HE. Placa radial trasplantada con puente óseo

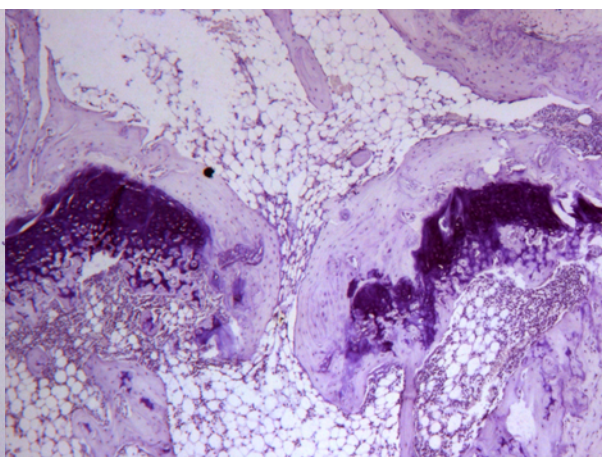


Fig 5.6.29. **Patrón B** 4x, tinción HE. Placa radial trasplantada con puente óseo

Resultados

A la arquitectura que se observa en una placa de crecimiento trasplantada que ha evolucionado al fracaso, aunque mantiene su estructura, con necrosis celular y aparición, si los hubiera, de puentes óseos, fibrosos u osteofibrosos se la ha denominado **Patrón B**. (Fig 5.6.28 y 5.6.29)

En este grupo de ensayos se han observado dos casos E0.2.1(06-317) y E0.2.4(06-315) tratados con MSCs en los que el patrón de crecimiento de la placa radial trasplantada tiene una evolución que se corresponde con al Patrón A.

En el **caso 06-315**, se observó defecto en el crecimiento de la longitud del radio de 12% comparado con el control. En el estudio radiológico se observó en el radio una línea (no una banda) radio-translúcida de la placa de crecimiento trasplantada. En el estudio histológico la altura media de la placa de crecimiento del radio es 222 μm ; la altura media (normal) del cúbito es 187 μm . La placa de crecimiento del radio tiene una arquitectura aparentemente normal, se identifican las zonas germinativa, proliferativa e hipertrófica. (Fig 5.6.30) En el borde distal de la epífisis del radio se observan áreas de interposición de un tejido fibroso en el que se aprecian células mononucleares, histiocitos y células plasmáticas.



Fig 5.6.30. Caso 06-315 Placas de crecimiento del cúbito(izd) y del radio (dcha) 2x, tinción HE

En el borde metafisario de la placa de crecimiento se observan trabéculas primarias y secundarias pero en menor cantidad que en el control. En algunas áreas del cartílago hipertrófico limitante se forman trabéculas condrales pero no se forman trabéculas óseas. Se observa pérdida del patrón normal de médula; en su lugar se observan un patrón celular con abundantes células monocelulares, histiocitos, células de la serie granulocítica, y células plasmáticas.

En tres casos E0.2.3(06-316); E0.2.5(06-310); E0.2.6(06-309) se observa que la placa de crecimiento trasplantada se encuentra expandida, la altura media de la placa es de 2.800

µm Sobre la zona del germinativo se observa en la epífisis del radio una banda ancha de tejido fibroso con un patrón abundante de células fibro-histiocitarias, células de estirpe granulocítica y células plasmáticas. En los márgenes laterales de la placa de crecimiento se observa el mismo patrón celular más la presencia de células gigantes multinucleadas, que recuerdan a clastos. En la zona condro-metafisaria no se observan trabéculas ósea primarias ni secundarias. La médula ósea adyacente carece de elementos celulares típicos, y abunda un patrón celular de células típicas de respuesta inflamatoria incluidas las células plasmáticas. (Fig 5.6.31 6 5.6.32)



Fig 5.6.31. **Patrón C** 1x, tinción HE. Placa cubital (izd) y radial (dcha) Caso 06-316

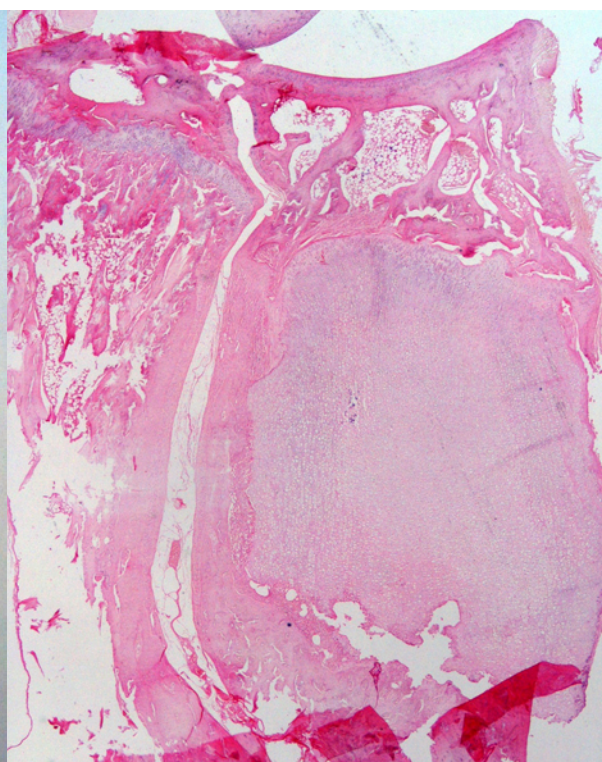


Fig 5.6.32. **Patrón C** 2x, tinción HE. Placa cubital (izd) y radial (dcha) Caso 06-316

En estos casos la altura media de la zona del germinativo es de 10 µm. Se observan células redondas en esta zona. Se continúa con la zona del proliferativo, su altura media es de 40 µm, es una zona mal conformada, en las que se observan muy pocas columnas y estas tienen pocas células, con células aplanadas y núcleo paralelo al eje transversal de la placa de crecimiento. En ambas zonas se observa que la matriz extracelular es homogénea y débilmente basófila. Se continúa con la zona hipertrófica, la altura media de esta zona es de 2.500 µm, en ella abundan condrocitos con núcleos redondos. A esta arquitectura histológica de la placa de crecimiento se la ha denominado **Patrón C**.

Se detalla la descripción del caso **E0.2.2 (06-303)**, por las peculiaridades específicas del mismo. En el corte histológico de este caso se observa la placa de crecimiento del cúbito y

Resultados

del radio. La placa de crecimiento del cúbito no ha sufrido agresión quirúrgica alguna, esta placa de crecimiento tiene una arquitectura tisular normal, por lo que corresponde al Patrón A. La altura media de la placa de crecimiento del cúbito es de 121 μm . La altura media de la zona del germinativo, proliferativo y del hipertrófico es de 15, 62, y 44 μm respectivamente. En la placa de crecimiento trasplantada del radio se observan tres patrones de respuestas diferentes:

1. En el tercio externo de la placa de crecimiento trasplantada se ha observado el Patrón C, descrito previamente. La altura media del germinativo en esta zona es de 12 μm . Se continua con la zona del proliferativo, altura media 3 μm , mal conformada, en la que se observan pocas columnas y pocas células por columna, continua con la zona hipertrófica, altura media 2.817 μm . (Fig 5.6.33 5.6.34)
2. En el tercio medio de la placa de crecimiento se observa que la zona germinativa, cuya altura media es de 8 μm , presenta abundantes células de núcleo redondo y otras de núcleos alargados y muy hipercromáticas. Se continua con la zona del proliferativo, altura media 22 μm , mal configurada, en la que se aprecian muy pocas columnas y con pocas células (2 ó 4 células por columna). Ambas zonas se encuentran en una matriz extracelular débilmente basófila. En la zona del proliferativo se observan células de estirpe condral y núcleo fusiforme y elongado, en estas células el eje mayor del núcleo es perpendicular al eje transversal de la placa de crecimiento. Esta zona se continua con la zona hipertrófica, altura media 3.055 μm . A partir de esta zona la placa de crecimiento se ensancha hacia los márgenes laterales y es complejo distinguir la celularidad de un lado u otro de la placa en esta zona. En esta zona se observan condrocitos con núcleos redondos de distintos tamaños, y condrocitos con núcleos irregulares, y otros con núcleos eosinófilos, todos ellos en una matriz débilmente basófila (Fig 5.6.35). Más distal, próximo a la metáfisis, aparece un patrón de condrocitos hipertróficos en columnas con núcleos redondos, hipercromáticos. En la unión condro-metafisaria aparece una banda de condrocitos hipertróficos que producen columnas de matriz extracelular que no osifica. En metáfisis no hay trabéculas óseas primarias ni secundarias. La médula ósea adyacente carece de elementos celulares típicos de ella. A la descripción de esta imagen histológica de la placa de crecimiento se la ha denominado **Patrón D**.
3. En el tercio proximal interno de la placa de crecimiento, continuando con la zona del germinativo y del proliferativo de esta zona, se aprecia un foco de tejido cartilaginoso con una peculiaridad morfológica diferente. Este foco tiene una longitud máxima de 650 μm y un ancho máximo de 287 μm . Se aprecia un grupo de células condras que tienden a independizarse de la zona proliferativa. A partir de la zona de cartilago normal se observan células que se intercalan entre ellas, células con cambio del fenotipo celular, mononucleares y con atípia celular. Se configuran clones celulares y aparecen células anaplásicas.



Fig 5.6.33. Caso 06-303. Placa de crecimiento del radio (dcha) 1x, tinción HE.

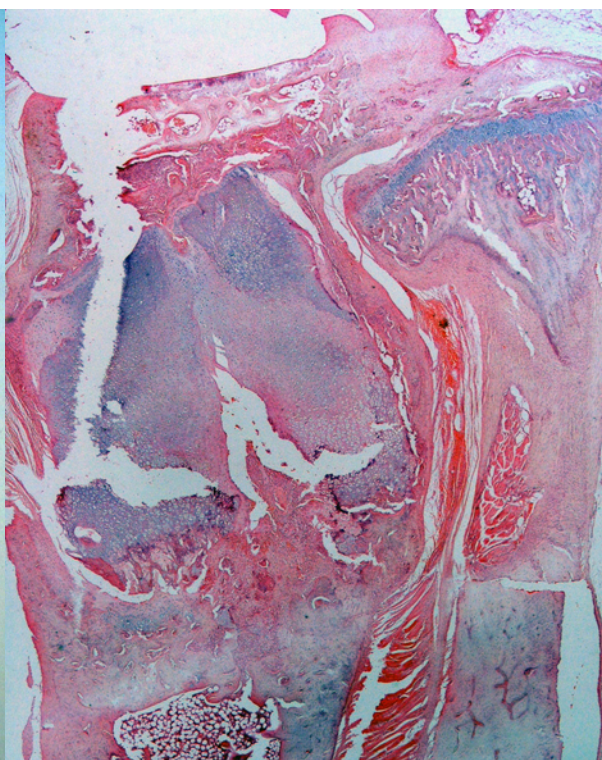


Fig 5.6.34. Caso 06-303. Placa de crecimiento del radio (dcha) 2x, tinción HE.

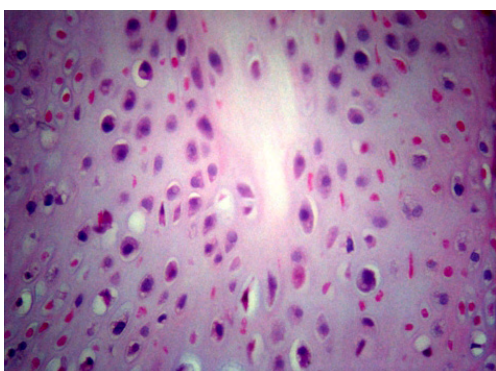


Fig 5.6.35. **Patrón D** Condrocitos con señales de displasia 20x tinción HE

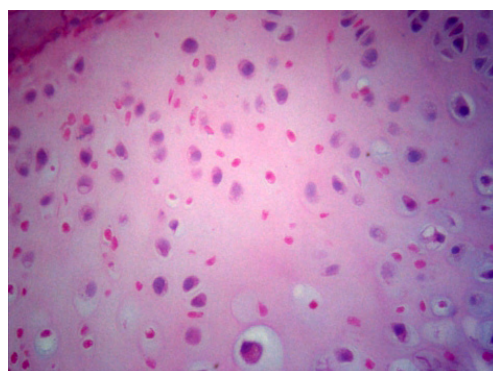


Fig 5.6.36. **Patrón E** Condrocitos con señales de anaplasia 20x, tinción HE

El patrón celular más predominante son células redondas, con núcleos ricos en cromatina y citoplasma granular eosinófilo, compatible con una célula epitelióide granular. Se aprecia hipercromatismo y pleomorfismo de núcleo y citoplasma, predominan núcleos alargados e hipercromáticos. Se observan variaciones importantes en el tamaño de los núcleos, los núcleos tienen un diámetro medio de 12 μm . Los núcleos de los condrocitos normales tienen un diámetro medio entre 5-7 μm . (Fig 5.6.36). Estas células, que no forman lagunas condrales, se encuentra en una matriz extracelular basófila. Se aprecian focos de necrosis tisular. En esta tercera zona de la la placa es en la única en la que se han observado

Resultados

células BrdU positivas. A la descripción de la imagen histológica descrita se la ha denominado **Patrón E**.

Grupo E0, Tiempo 24 semanas

Caso E0.3.1 (06-889) La placa tiene un crecimiento muy profuso, con una reacción inmunológica muy grande. Tiene un patrón C de crecimiento, con un germinativo hipercelular, un proliferativo discreto y un hipertrófico exuberante (Fig 5.6.37). En los márgenes tiene un tejido fibroconjuntivo con fibrosis y granulomas, falta el anillo a ambos lados, la interacción con la epífisis esta bien, pero en el lado metafísario no hay trabéculas primarias ni secundarias. Altura de la placa del radio 2.350 μm

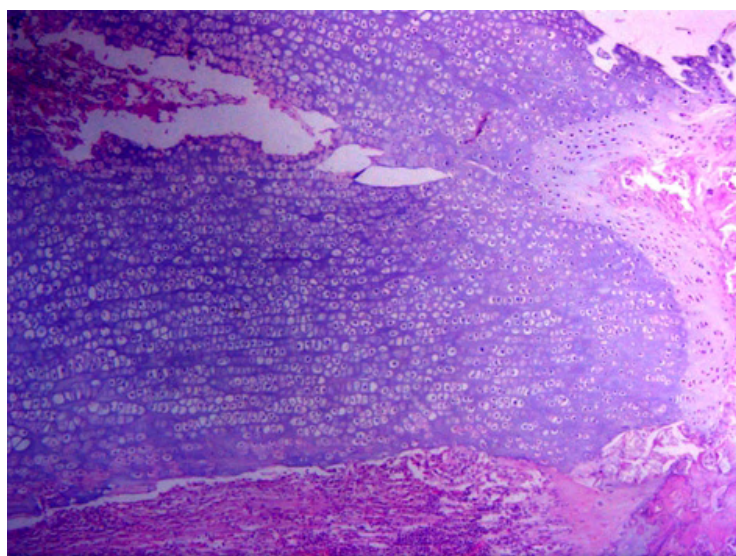


Fig 5.6.37. Caso E0.3.1. Placa de crecimiento radial 4x, tinción HE

Caso E0.3.2 (06-890) La placa tiene un crecimiento exuberante, con un patrón de crecimiento C y una reacción inmunológica muy grande que ha invadido y fragmentado la placa.

Caso E0.3.3 (06-892) La placa tiene un crecimiento exuberante. Tiene un patrón de crecimiento C, con un germinativo y proliferativo discretos y un hipertrófico muy expandido. Altura de la placa del radio 2.500 μm

Caso E0.3.4 (06-896) La placa tiene un crecimiento exuberante, con un patrón de crecimiento C y una reacción inmunológica muy pronunciada que ha destruido la placa (Fig 5.6.38 y 5.6.39).

Caso E0.3.5 (06-895) La placa tiene también un crecimiento exuberante, con un patrón de crecimiento C, la reacción inmunológica es menor, tiene un gran puente óseo central. Altura de la placa del radio 1.500 μm

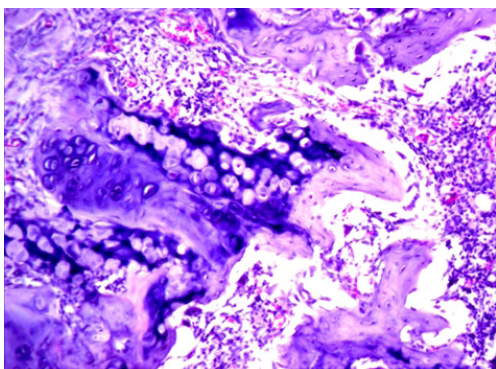


Fig 5.6.38.Caso E0.3.4 Fragmentación de la placa

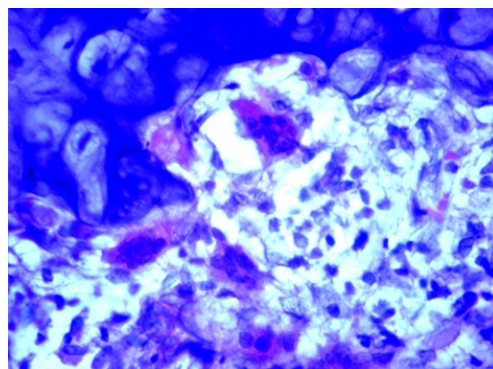


Fig 5.6.39.Caso E0.3.4 Condroclastos

Caso E0.3.6 (06-886) La placa tiene un crecimiento expansivo exuberante. Tiene un patrón de crecimiento C, esta rodeada de tejido fibroso que se come el hueso y el cartílago. No hay trabéculas primarias ni secundarias. (Fig 5.6.40 y 5.6.41)

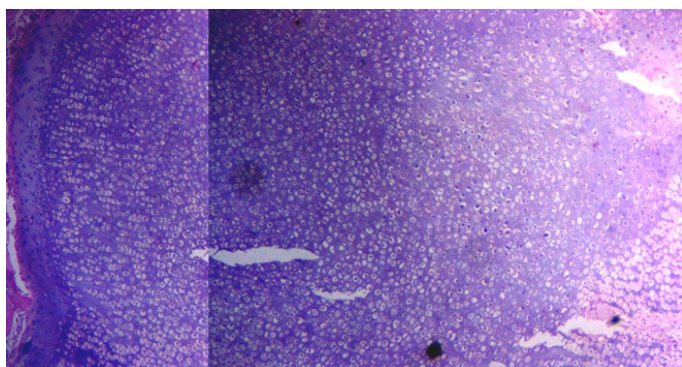


Fig 5.6.40.Caso E0.3.6 Imágenes unidas mostrando la totalidad de la placa. 4x tinción HE

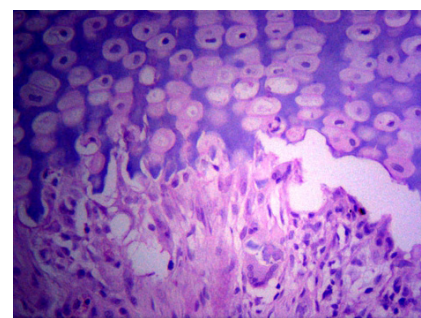


Fig 5.6.41.Caso E0.3.6 Borde del hipertrófico, 20x tinción HE

Tabla 5.6.6. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía E, tratamiento con MSC en trasplante, 24 sem.

Casos	Estruc.	Colum	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente	Infilt.	IR
E0.3.1	1	0	2	1	2	0	1	0	2	9
E0.3.2	9	0	2	1	2	2	2	0	2	20
E0.3.3	4	1	1	1	2	2	2	0	2	15
E0.3.4	9	0	1	1	2	0	2	0	2	17
E0.3.5	1	0	2	1	2	2	2	2	1	13
E0.3.6	1	1	3	1	2	1	2	0	2	13
Sumas	25	2	11	6	12	7	11	2	11	87
IR promedio:			14,5	Clasificación: Alteración intensa						

Resultados

El índice de respuesta para el grupo con tratamiento con MSCs a las 24 semanas del trasplante indicado en la tabla 5.6.6 es de 14, lo que clasifica al grupo como de reacción intensa.

En este grupo encontramos una respuesta inflamatoria intensa que ha invadido y destruido la placa en dos de los casos, sólo en uno de los casos en que la respuesta inmunológica es menor hemos encontrado la formación de puentes óseos. La celularidad de germinativo y proliferativo las podemos clasificar como de normales a discretamente aumentadas, en el hipertrófico el aumento de la celularidad es enorme. La estructura y columnación esta dentro de la normalidad en los casos en que la placa no ha sido destruida.

5.6.4 Serie E15. Tratamiento con MSCs

Animales con trasplante de la fisis radial distal estimulados con células MSCs a los 15 días del trasplante. La serie se dividió en 3 grupos, valorando la placa a las 6, 12 y 24 semanas post-trasplante.

Grupo E15. Tiempo 6 semanas

Caso E15.1.1 (06-160) La placa tiene un crecimiento en anchura que se corresponde con la metáfisis. Tiene un patrón de crecimiento A, esta rodeada de tejido fibroso e infiltrado inflamatorio.

Altura de la placa radial 115 μm

Caso E15.1.2 (06-154) Es un caso similar al anterior, la placa se encuentra expandida con un crecimiento exuberante. Tiene un patrón de crecimiento B, esta rodeada de tejido fibroso e infiltrado inflamatorio.

Altura de la placa radial 1.830 μm

Caso E15.1.3 (06-179) Es un caso similar al anterior, la placa ha crecido en anchura, hay hipercelularidad en todas las zonas. Tiene un patrón de crecimiento B, esta rodeada de tejido fibroso e infiltrado inflamatorio.

Altura de la placa radial 1.183 μm

Caso E15.1.4 (06-180) Es un caso similar a los anteriores con una placa muy expandida que ha crecido en toda su anchura, hay hipercelularidad en todas las zonas. Tiene un patrón de crecimiento B, esta rodeada de tejido fibroconjuntivo pero el componente infiltrativo es pequeño. El anillo es atrófico. Se observa presencia de infiltrado inflamatorio.

Altura de la placa radial 1.850 μm

Caso E15.1.5 (06-169) La placa no ha crecido en toda su anchura, es una placa pequeña con un puente óseo. Tiene una alteración periférica del crecimiento que afecta a las 3 zonas y esta rodeada de un infiltrado inflamatorio.

Altura de la placa radial en zona central 280 μm , en zona periférica 85 μm .

Caso E15.1.6 (06-159) La placa en este caso es una placa pequeña no expandida con un puente óseo central, no hay infiltrado inflamatorio. Tiene un patrón de crecimiento A

Altura de la placa radial 300 μm , altura placa cubital 190 μm .

Tabla 5.6.7. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía E, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante, tiempo 6 semanas

Casos	Estruc.	Colum	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente	Infilt.	IR
E15.1.1	0	0	3	0	2	1	2	1	1	10
E15.1.2	0	0	3	1	2	2	2	1	1	12
E15.1.3	0	1	3	1	2	2	2	1	1	13
E15.1.4	0	0	3	1	2	2	2	1	2	13
E15.1.5	4	2	3	1	2	2	2	2	1	19
E15.1.6	0	0	3	1	2	1	2	2	0	11
Sumas	4	3	18	5	12	10	12	8	6	78
IR promedio:			13	Clasificación: Alteración intensa						

El índice de respuesta en la valoración a las 6 semanas para el grupo con tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante indicado en la tabla 5.6.7 es de 13, lo que clasifica al grupo de alteración intensa.

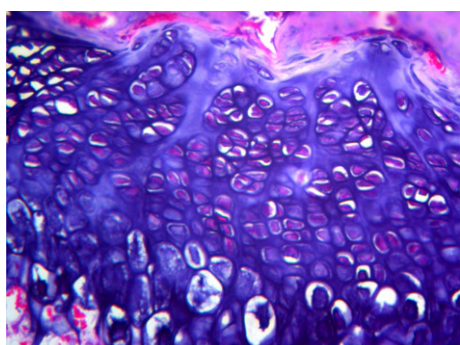


Fig 5.6.42. Caso E15.1.6 Germinativo placa cubital 20x tinc HE

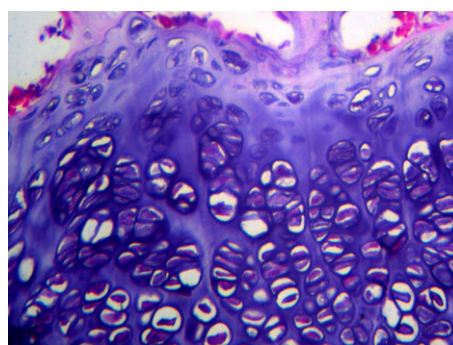


Fig 5.6.43. Caso E15.1.6 Germinativo expandido en placa radial 20x, tinc HE

En este grupo encontramos que la estructura y columnación están normales, con un patrón de crecimiento para todos los casos entre A y B. La respuesta inflamatoria es

Resultados

moderada. Lo más característico del grupo es la hiper celularidad en todas las zonas sobre todo en germinativo encontrada incluso en los casos en que la placa no ha tenido una expansión exagerada. (Fig 5.6.42 y 5.6.43)

Grupo E15. Tiempo 12 semanas

Caso E15.2.1 (06-504) La placa tiene un crecimiento irregular y distorsionado. Tiene un patrón de crecimiento B, expandido, hay hiper celularidad en todas las zonas, el anillo es hipertrófico y las zonas de unión con epífisis y metáfisis están alteradas.

Altura de la placa radial 600 μm

Caso E15.2.2 (06-505) La placa tiene un patrón de crecimiento B. Las 3 capas están expandidas. En proliferativo e hipertrófico las células están separadas y se pierde la columnación, las células han perdido algo de su fenotipo y estructura típica. El componente inflamatorio es moderado.

Altura de la placa radial 1.250 μm

Caso E15.2.3 (06-509) La placa tiene un crecimiento distorsionado. Tiene un patrón de crecimiento B, expandido, con hiper celularidad en todas las zonas

Altura de la placa radial 900 μm

Caso E15.2.4 (06-510) La placa tiene un patrón de crecimiento B expandido, hay hiper celularidad en todas las zonas, el componente inflamatorio es escaso.

Caso E15.2.5 (06-508) La placa tiene un patrón de crecimiento B, expandido, es un caso similar al anterior.

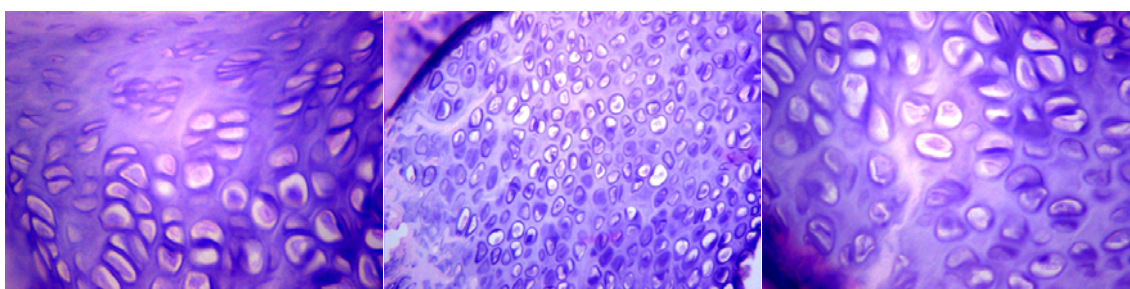
Caso E15.2.6 (06-507) La placa tiene un patrón de crecimiento B, es un caso similar a los anteriores.

Tabla 5.6.8. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía E, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante, tiempo 12 semanas

Casos	Estruc.	Colum	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente	Infilt.	IR
E15.2.1	9	6	3	2	2	2	2	0	1	27
E15.2.2	6	6	3	1	2	2	2	0	1	23
E15.2.3	9	4	3	1	2	2	2	0	0	23
E15.2.4	6	4	3	1	2	1	2	0	0	19
E15.2.5	6	4	3	1	2	1	2	0	1	20
E15.2.6	6	4	3	2	2	1	2	0	0	20
Sumas	42	28	18	8	12	9	12	0	3	132
IR promedio:			22,0	Clasificación: Alteración intensa						

El índice de respuesta en la valoración a las 12 semanas para el grupo con tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante indicado en la tabla 5.6.8 es de 22,0, lo que clasifica al grupo de alteración intensa

En este grupo encontramos que la estructura y columnación están distorsionadas, con un patrón de crecimiento B para todos los casos. La respuesta inflamatoria es moderada. Lo más característico del grupo es la hiper celularidad encontrada en todas las zonas, con alteración del fenotipo celular normal. (Fig 5.6.44, 5.6.45 y 5.6.46)



*Fig 5.6.44. Caso E15.2.2
proliferativo 20x tinción HE*

*Fig 5.6.45. Caso E15.2.2
Hipertrófico 10x tinción HE*

*Fig 5.6.46. Caso E15.2.2
Transición proliferativo-
hipertrófico 20x tinción HE*

Grupo E15. Tiempo 24 semanas

Caso E15.3.1 (06-725) La placa tiene un patrón de normalidad y ha crecido en toda su anchura. Tienen un germinativo notable pero con un patrón de celularidad normal en todas las zonas, con predominio de adipocitos. En la zona marginal del germinativo hay una banda de tejido fibroso. Tiene un puente óseo central.

Caso E15.3.2 (06-726) La placa tiene un patrón de normalidad y ha crecido en toda su anchura. Tienen un germinativo pobre, un proliferativo con columnación normal y un hipertrófico donde se pierde la columnación. La unión con la epífisis es normal, con la metáfisis también es normal pero hay pocas trabéculas.

Caso E15.3.3 (06-727) La placa ha crecido en toda anchura, la podríamos clasificar como una placa totalmente normal excepto porque forma pocas trabéculas óseas

Caso E15.3.4 (06-728) La placa tiene un patrón de normalidad y ha crecido en toda su anchura. La placa es del mismo tamaño que la del cúbito pero con una mayor celularidad. Es una placa normal que se esta cerrando.

Caso E15.3.5 (06-729) La placa ha crecido en toda anchura, tiene un patrón normal, el anillo esta bien y en la zona metafisaria forma trabéculas óseas.

Caso E15.3.6 (06-727) La placa ha crecido en toda anchura, y tiene un patrón de normalidad como los casos anteriores.

Resultados

Tabla 5.6.9. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía E, tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante, tiempo 24 semanas

Casos	Estruc.	Column	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente	Infilt.	IR
E15.3.1	1	2	2	1	2	1	1	2	0	12
E15.3.2	0	0	2	1	2	0	0	0	0	5
E15.3.3	1	0	2	2	2	1	1	2	0	11
E15.3.4	2	0	4	2	2	1	2	0	0	13
E15.3.5	0	0	3	1	2	0	2	0	0	8
E15.3.6	2	0	4	3	2	1	1	0	0	13
Sumas	6	2	17	10	12	4	7	4	0	62
IR promedio:			10,33	Clasificación: alteración discreta						

El índice de respuesta para el grupo con tratamiento con MSC a los 15 días del trasplante indicado en la tabla 5.6.9 es de 10,33 lo que clasifica al grupo de alteración discreta. En este grupo encontramos un patrón de normalidad con una menor formación de trabéculas óseas y en todas las zonas con una mayor celularidad que la placa cubital.

5.6.5 Serie JC sin terapia celular

Corresponde a animales con trasplante de la placa radial distal con una pequeña fracción de hueso metafisario y que no recibieron tratamiento celular. En esta serie se realizaron dos grupos de valoración a las 6 y 12 semanas post-trasplante.

Grupo JC. Tiempo 6 semanas

Caso: JC.1.1 (07-117) En el corte analizado, se observa que la placa ha crecido en toda su anchura pero esta muy alterada. No se observa columnación de las células, se observa fibrilación en la matriz extracelular. La placa tiene unas dimensiones normales pero está tremendamente alterada. (Fig 5.6.47 y 5.6.48)

Altura de la placa radial 150 μ m

Caso: JC.1.2 (07-114) En el corte analizado, se observa que la placa está desestructurada, hay anomalías en todas las zonas, se observan algunas columnas en zonas laterales. Se observan puentes óseos y fibrosos.

Caso: JC.1.3 (07-110) La placa tiene un crecimiento en anchura completo. En la zona central del proliferativo se ha producido un gran infiltrado de vasos que invaden la placa. (Fig 5.6.49 y 5.6.50)

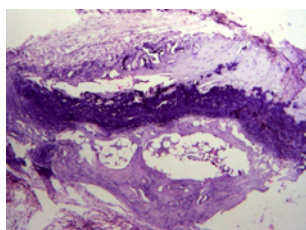


Fig 5.6.47. Caso JC.1.1
Placa crec, 4x tin HE

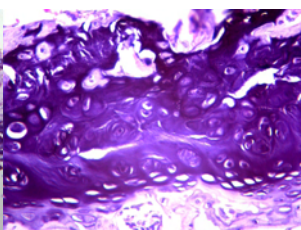


Fig 5.6.48. Caso JC.1.1
Placa alterada. 10x HE

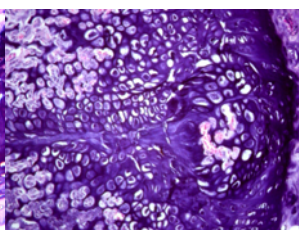


Fig 5.6.49. Caso JC.1.3
Placa zona central 10x HE

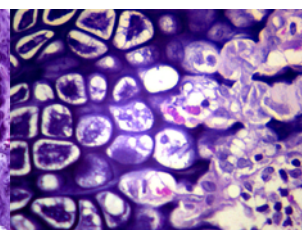


Fig 5.6.50. Caso JC.1.3
Infiltr. vascular 40x tinc HE

Caso: JC.1.4 (07-111) La placa tiene una estructura normal. Hay un gran infiltrado inflamatorio que no interrumpe la vascularización, los vasos presentan en su interior imágenes con hematíes en “pila de monedas”. (Fig 5.6.51 y 5.6.52)

Caso: JC.1.5 (07-130) La placa esta destruida, desestructurada, tiene un gran puente óseo central, no hay trabéculas, no hay tampoco infiltrado inflamatorio, pero sin embargo la médula ósea es grasa. (Fig 5.6.53)

Caso: JC.1.6 (07-114) La placa esta destruida, hay un patrón infiltrativo tan grande que ha destruido la placa de crecimiento.

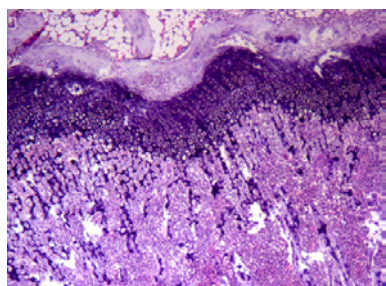


Fig 5.6.51. Caso JC.1.4 Placa
normal 4x tinc HE

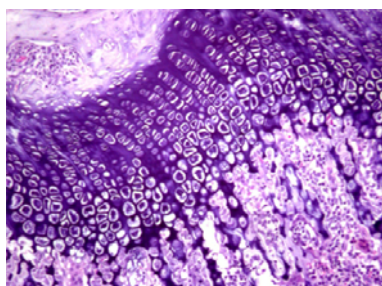


Fig 5.6.52. Caso JC.1.4 Inf.
inflam. 10x tinc HE

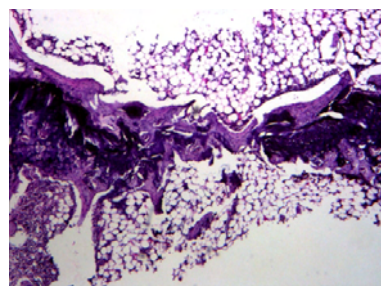


Fig 5.6.53. Caso JC.1.5 médula
ósea grasa

Tabla 5.6.10. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía J, sin tratamiento celular, tiempo 6 semanas

Casos	Estruc.	Colum	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente	Infilt.	IR
JC.1.1	9	6	6	3	2	2	2	0	0	30
JC.1.2	9	3	6	2	2	2	2	6	1	33
JC.1.3	0	2	4	2	2	2	2	0	2	16
JC.1.4	0	0	4	3	0	2	2	0	2	13
JC.1.5	9	6	6	3	2	2	2	6	0	36
JC.1.6	9	6	6	3	2	2	2	0	2	32
Sumas	36	23	32	16	10	12	12	12	7	160
IR promedio: 26,6					Clasificación: Alteración completa					

El índice de respuesta en la valoración a las 6 semanas para el grupo sin tratamiento celular con el modelo de cirugía J indicado en la tabla 5.6.10 es de 26,6 que

Resultados

clasifica al grupo como alteración completa.

En este grupo encontramos una respuesta inflamatoria muy grande que llega incluso, en algún caso, a destruir completamente la placa. En los 2 casos en que esa respuesta inflamatoria no se ha producido se han formado puentes óseos. Hay hipocelularidad en el germinativo en todos los casos y también en proliferativo e hipertrófico, excepto en los casos 3 y 4 en que hay hiper celularidad en estas zonas.

Grupo JC. Tiempo 12 semanas

Caso: JC.2.1 (07-262) La placa tiene una estructura normal, la celularidad tiene un patrón de normalidad con hipocelularidad en todas las zonas.

Caso: JC.2.2 (07-253) La placa esta completamente desestructurada, ha perdido la columnación, tiene un gran puente óseo. (Fig 5.6.57)

Caso: JC.2.3 (07-283) La placa tiene todos los criterios de normalidad, ha crecido en anchura y altura, las columnas son completas, el anillo es hipotrófico, las uniones con epífisis y metáfisis son normales. Hay hipocelularidad en germinativo. Ha formado abundantes trabéculas. La zona epifiso-metafisaria esta rodeada por abundante tejido fibroso (Fig 5.6.54, 5.6.55 y 5.6.56)

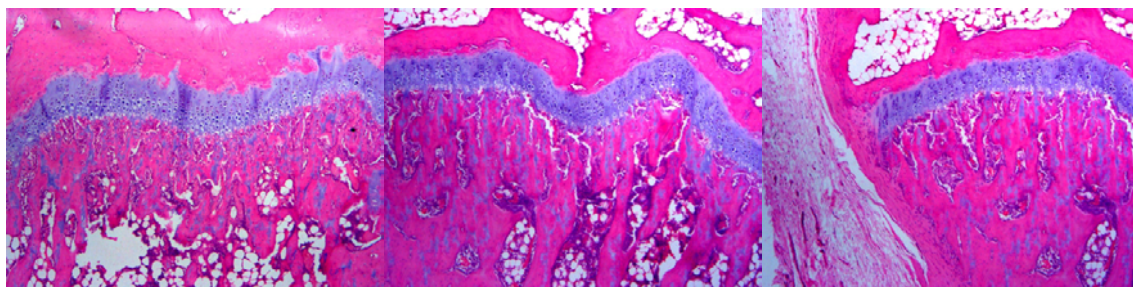


Fig 5.6.54. Caso JC.2.3 Placa control decha. 4x tinc HE

Fig 5.6.55. Caso JC.2.3 Placa rad. izd abund trabéculas 4x HE

Fig 5.6.56. Caso JC.2.3 Fibrosis lateral 4x HE

Caso: JC.2.4 (07-261) La placa ha crecido en anchura, y mantiene una estructura normal. Hay hipocelularidad en las 3 zonas. Esta rodeada en la epífisis por un tejido óseo y fibroso donde hay vasos con trombosis, en la zona de la metáfisis no hay trabéculas primarias y muy pocas secundarias.

Caso: JC.2.5 (07-251) La placa ha crecido en anchura de forma completa pero se encuentra desestructurada, tiene un gran puente óseo marginal y la columnas están alteradas, con hipocelularidad en las 3 zonas, las uniones con epífisis y metáfisis están alteradas.

Caso: JC.2.6 (07-254) La placa ha crecido en anchura de forma completa. Tiene abundantes puentes óseos y fibrosos que la rompen en múltiples zonas. Tiene hipocelularidad en las 3 zonas, como todo el grupo, las uniones con epífisis y metáfisis están bien, forma

trabéculas muy groseras.

Tabla 5.6.11. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía J, sin tratamiento celular, tiempo 12 semanas

Casos	Estruc.	Colum	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente	Infilt.	IR
JC.2.1	0	6	6	3	2	1	1	0	1	20
JC.2.2	9	6	6	3	2	2	2	6	0	36
JC.2.3	0	0	1	0	1	0	0	1	0	3
JC.2.4	0	0	6	2	2	2	2	2	1	17
JC.2.5	6	6	6	2	2	2	2	4	0	30
JC.2.6	9	6	6	3	2	0	0	6	0	32
Sumas	24	24	31	13	11	7	7	19	2	138
IR promedio:			23	Clasificación: Alteración intensa						

El índice de respuesta en la valoración a las 12 semanas para el grupo sin tratamiento celular con el modelo de cirugía J indicado en la tabla 5.6.11 es de 23 que clasifica al grupo como alteración intensa.

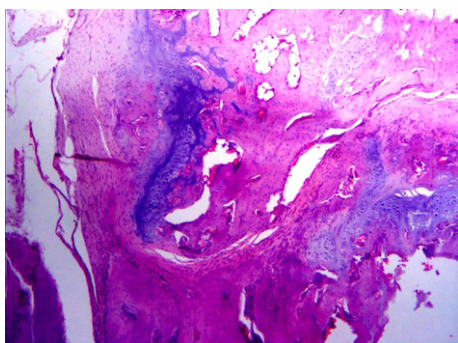


Fig 5.6.57. Caso JC.2.2 puente óseo 4x tinc HE

En este grupo encontramos una enorme formación de puentes óseos y fibrosos que llegan incluso, en algunos casos, a destruir completamente la placa. Curiosamente el infiltrado inflamatorio está prácticamente ausente en todo el grupo. (Fig 5.6.57)

5.6.6 Serie J15. Tratamiento con MSCs

Animales con trasplante de la fisis radial distal con una pequeña fracción de hueso metafisario estimulados con células MSC a los 15 días del trasplante. En esta serie se realizaron dos grupos de valoración a las 6 y 12 semanas post-trasplante.

Grupo J15. Tiempo 6 semanas

Caso: J15.1.1 (07-103) La placa está completa, ha crecido en anchura, y mantiene una estructura normal. (Fig 5.6.58 y 5.6.59)

Resultados

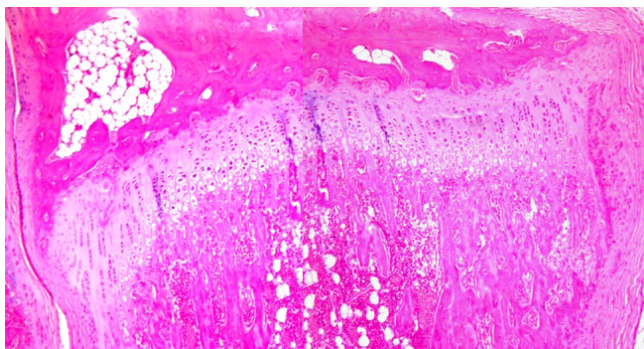


Fig 5.6.58. Caso J15.1.1 Placa radial intervenida completa. 4x tinción HE

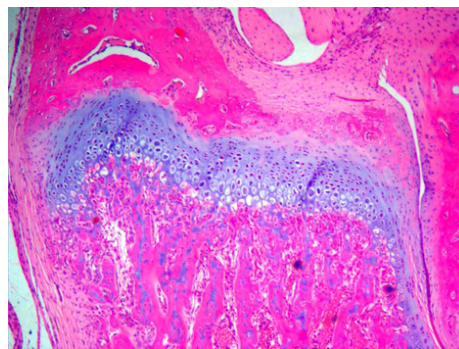


Fig 5.6.59. Caso J15.1.1 Placa cubital 4x, tinción HE

La celularidad es normal en las 3 zonas. (Fig 5.6.60 y 5.6.61). Con la epífisis mantiene un buen contacto pero hay focos de trombosis. La unión con la metáfisis es normal y forma trabéculas.

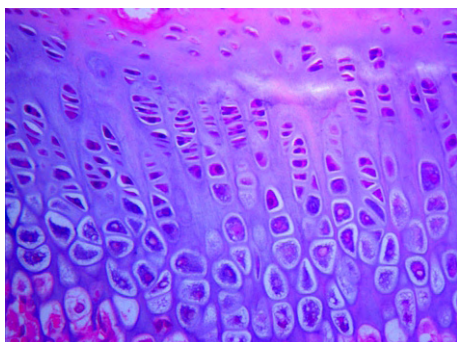


Fig 5.6.60. Caso J15.1.1 Germinal y proliferativo placa radial 20x tinc HE

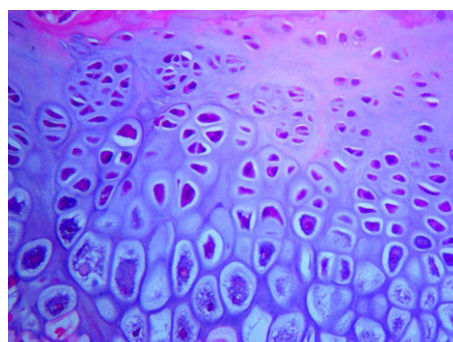


Fig 5.6.61. Caso J15.1.1 Germinal y proliferativo placa cubital, 20x tinc HE

Caso: J15.1.2 (07-102) La placa esta expandida, ha crecido de forma exuberante con un patrón de crecimiento B. En la zona central hay un puente osteofibroso. El germinativo es hipocelular, en proliferativo e hipertrófico hay hipercelularidad. Hay una banda de tejido fibroso rodeando la placa. En el hipertrófico hay trabéculas condrales y trabéculas óseas en regiones laterales. (Fig 5.6.63). En la zona marginal hay un patrón de carácter inflamatorio que se ha comido gran parte de la placa. (Fig 5.6.62)

Altura de la placa radial 1.550 μm , altura de la placa cubital 203 μm

Caso: J15.1.3 (07-101) La placa esta expandida, ha crecido en anchura con un patrón de crecimiento B. El germinativo no esta estimulado, con células mas alargadas que redondas, el proliferativo también es hipocelular, con las columnas centrales alteradas. El hipertrófico esta muy expandido con una altura en torno a las 2.500 μm .

La placa esta rodeada de tejido fibroconjuntivo muy abundante y tejido inflamatorio. En el centro hay puentes óseos y fibrosos que han fragmentado la placa. (Fig 5.6.64)

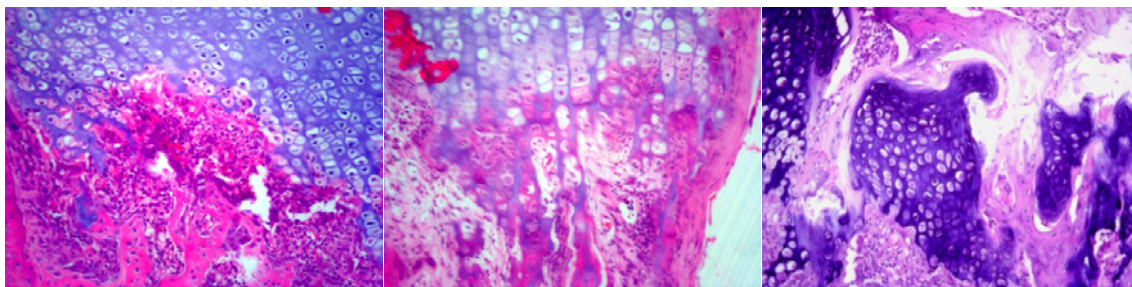


Fig 5.6.62. Caso J15.1.2 Infiltrado
10x tinc HE

Fig 5.6.63. Caso J15.1.2
trabéculas óseas 10x tinc HE

Fig 5.6.64. Caso J15.1.3 Puente
óseo 10x tinc HE

Caso: J15.1.4 (07-106) La placa está expandida, ha crecido de forma exuberante con un patrón de crecimiento C. El germinativo es amplio y esta estimulado, el proliferativo es pobre con columnas pequeñas, en algunos sitios el eje de las células se verticaliza y hay muy pocas células (Fig 5.6.65 y 5.6.66). El hipertrófico esta muy estimulado. Hay infiltrado inflamatorio rodeando la placa por algunas zonas (Fig 5.6.65).

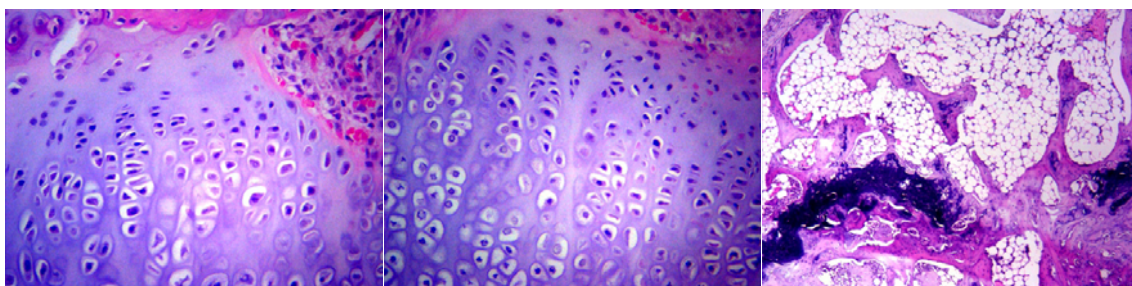


Fig 5.6.65. Caso J15.1.4 cel
verticalizadas Patrón C, 20x HE

Fig 5.6.66. Caso J15.1.4 Prol
pobre y cél semi-rotadas. 20x HE

Fig 5.6.67. Caso J15.1.5 Punt.
óseo y adipocitos 10x tinc HE

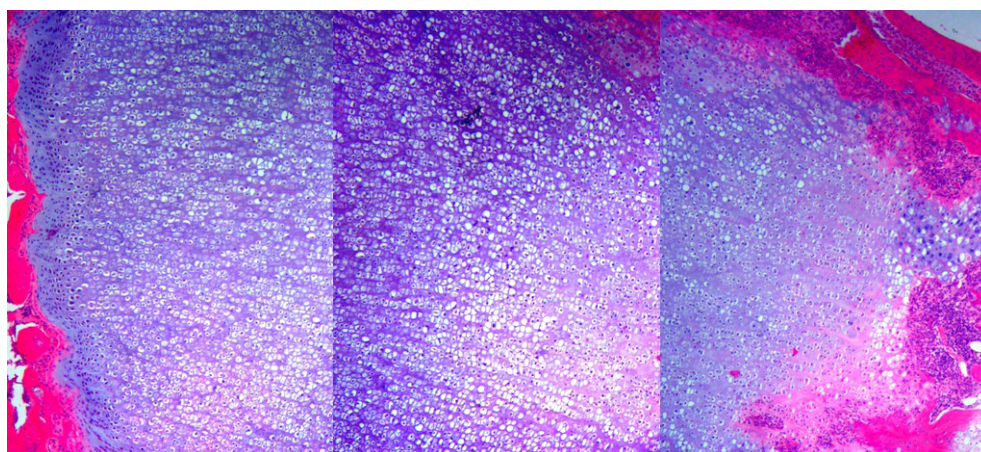


Fig 5.6.68. Caso J15.1.6 Imágenes unidas mostrando la totalidad de la placa, donde prácticamente todo es hipertrófico, la zona epifisaria izd, a la dcha zona metafisaria

Caso: J15.1.5 (07-107) La placa no está expandida, es un caso en el que hubo problemas en la administración celular. Hay un fracaso de la placa, con un puente óseo

Resultados

central, un patrón infiltrativo mínimo y abundantes adipocitos (Fig 5.6.67).

Caso: J15.1.6 (07-109) La placa esta expandida, tanto en anchura como en longitud. El germinativo esta estimulado, el proliferativo es normal y el hipertrófico es exuberante con una altura de 3.150 μm . (Fig 5.6.68)

La placa esta rodeada de tejido fibroso con un infiltrado inflamatorio y trombosis vascular. Hay cambios en la celularidad, en algunas zonas aparecen clones con dimorfismo celular (anaplasias).

Tabla 5.6.12. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía J, tratamiento celular con MSC a los 15 días del trasplante, tiempo 6 semanas

Casos	Estruc.	Column	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente	Infilt.	IR
J15.1.1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
J15.1.2	2	2	4	2	1	2	2	2	0	17
J15.1.3	3	2	5	2	2	2	2	2	1	21
J15.1.4	0	6	4	2	1	2	2	0	1	18
J15.1.5	0	0	2	1	2	2	2	2	0	11
J15.1.6	0	3	2	2	2	0	2	0	1	12
Sumas	5	13	17	9	9	9	10	6	3	81
IR promedio:		13,5	Clasificación: Alteración intensa							

El índice de respuesta en la valoración a las 6 semanas para el grupo con tratamiento celular con MSC a los 15 días del trasplante, modelo de cirugía J indicado en la tabla 5.6.12 es de 13,5 que clasifica al grupo como alteración intensa. En este grupo hay que destacar la exuberante expansión del hipertrófico en los casos en que se conserva la placa y no ha sido fragmentada por la formación de puentes osteofibrosos. El infiltrado inflamatorio existe en algunos casos rodeando la placa pero en ninguno la ha invadido.

Grupo J15. Tiempo 12 semanas

Caso: J15.2.1 (07-233) La placa esta expandida a base del hipertrófico. Hay hiper celularidad en germinativo, el proliferativo es hipocelular sobre todo en la zona lateral, el hipertrófico es hiper celular y esta muy expandido y el anillo es muy abundante en células. Sobre la zona del germinativo hay alguna zona de tejido fibroso (Fig 5.6.70)

El hipertrófico tienen lagunas condrocíticas vacías y alcanzan la metafisis sin el patrón nuclear. No hay trabéculas primarias ni secundarias. Esta rodeada de tejido fibroso con un patrón infiltrativo con células mononucleadas en región metafisaria . (Fig 5.6.69)

Altura de la placa radial 1.133 μm

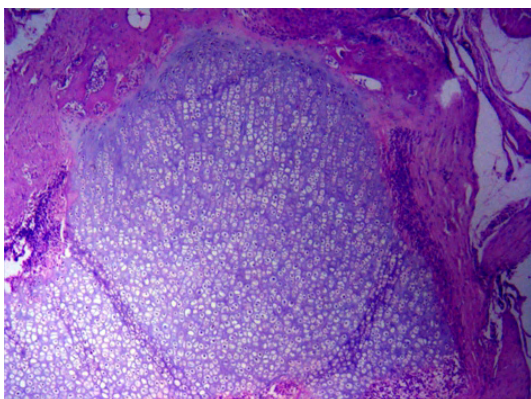


Fig 5.6.69. Caso J15.2.1 Placa radial 4x, tinción HE

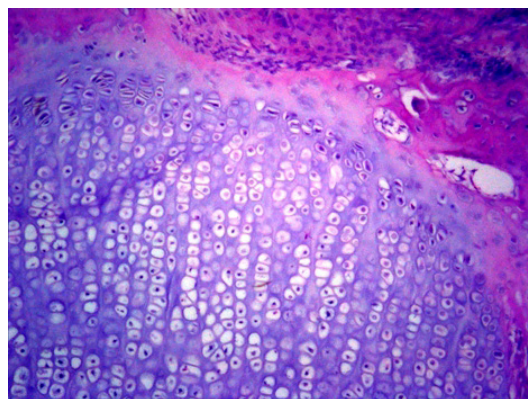


Fig 5.6.70. Caso J15.1. Tej fibroso en germinativo 10x tinción HE

Caso: J15.2.2 (07-232) La placa esta expandida a base del hipertrófico. Hay hiper celularidad en germinativo, hipocelularidad en proliferativo y tiene un hipertrófico hiper celular y muy expandido, es un caso semejante al anterior.

Caso: J15.2.3 (07-244) La placa esta muy distorsionada, es irregular pero mantiene la estructura. La columnación esta muy alterada, es hipocelular en las 3 zonas con puentes óseos.

Caso: J15.2.4 (07-235) La placa esta expandida a base del hipertrófico.(Fig 5.6.71) El germinativo es pequeño pero esta dentro de la normalidad, el proliferativo es hiper celular, esta más ordenado y abundante que el patrón normal. El hipertrófico esta muy expandido. Está rodeada de tejido infiltrativo, este predomina en médula ósea, con células gigantes abundantes, y sin trabéculas primarias ni secundarias. En el hipertrófico alternan células con núcleo redondo con otras en proceso de división. (Fig 5.6.72)

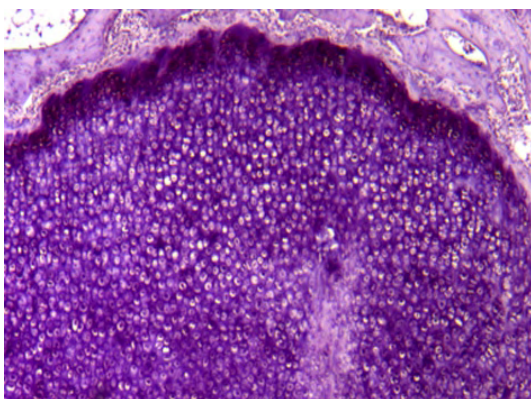


Fig 5.6.71. Caso J15.2.4 Placa radio expandida 4x, tinción HE

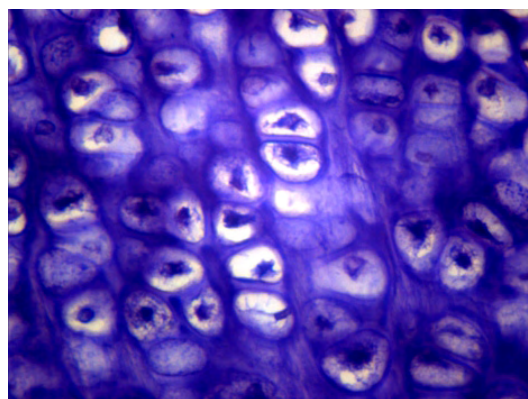


Fig 5.6.72. Caso J15.2.4 Hipertrófico con cel. en división 40x, tinción AA

Caso: J15.2.5 (07-243) La placa tiene un crecimiento completo con una reacción

Resultados

infiltrativa abundante a su alrededor. La estructura este dentro de un patrón de normalidad. Hay hipercelularidad en germinativo y proliferativo, el hipertrófico es normal, se han formado trabéculas primarias y secundarias en la metáfisis. (Fig 5.6.73 y 5.6.74)

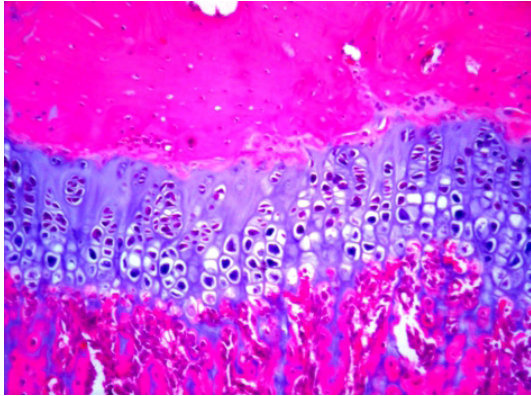


Fig 5.6.73. J15.2.5 Placa radial contr decha 10x, tinción HE

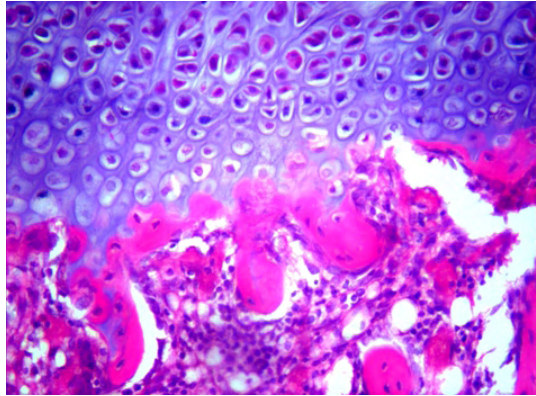


Fig 5.6.74. J15.2.5 Hipertrófico y trabéculas 20x, tinción HE

Caso: J15.2.6 (07-237) La placa esta expandida a base del hipertrófico. Hay hipercelularidad en germinativo, hipocelularidad en proliferativo e hipercelularidad en hipertrófico, es un caso semejante a los anteriores.

Tabla 5.6.13. Valoración de la reacción de la placa. Cirugía J, tratamiento celular con MSC a los 15 días del trasplante, tiempo 12 semanas

Casos	Estruc.	Colum	Célula	Matriz	Anillo	U-Epif	U-Meta	Puente	Infilt.	IR
J15.2.1	4	2	5	1	2	2	2	2	2	22
J15.2.2	4	2	5	2	2	2	2	1	1	21
J15.2.3	4	6	6	3	2	2	2	2	1	28
J15.1.4	0	2	2	2	2	1	2	0	2	13
J15.1.5	0	0	2	0	2	1	0	0	2	7
J15.1.6	4	2	2	2	2	1	2	0	1	16
Sumas	16	14	22	10	12	9	10	5	9	107
IR promedio: 17,8 Clasificación: Alteración intensa										

El índice de respuesta en la valoración a las 12 semanas para el grupo con tratamiento celular con MSC a los 15 días del trasplante, modelo de cirugía J indicado en la tabla 5.6.13 es de 17,8 que clasifica al grupo como alteración intensa.

En este grupo hay que destacar, como en el anterior, la exuberante expansión del hipertrófico, la placa mantiene su estructura, el infiltrado inflamatorio existe rodeando la placa pero que en ninguno caso la ha invadido.

5.6.7 Resumen del estudio histológico

Resumen de los resultados obtenidos en la valoración histológica mediante tinciones convencionales de la articulación intervenida para los dos tipos de cirugía realizada, y las diferentes pautas de tratamiento con y sin células MSCs.

Los resultados tabulados de valoración de cada grupo se han expresado en porcentaje de lesión con respecto a la puntuación máxima posible para cada zona afectada. Estos resultados se indican en la tabla 5.6.14 para cada serie de ensayos y tiempos de evaluación.

Tabla 5.6.14: Resumen de los resultados obtenidos en porcentaje de lesión para cada zona afectada

		EC	E0	E15	JC	J15
6 semanas	Estructura	83,3	16,6	7,4	66,6	9,2
	Columnas	94,4	50	8,3	63,3	36,1
	Celularidad	88,8	47,2	50	88,8	47,2
	Matriz	100	55,5	27,7	88,8	50
	Anillo pericondral	100	83,3	100	83,3	75
	Unión epífisis	75	58,3	83,3	100	75
	Unión metáfisis	100	58,3	100	100	83,3
	Puentes óseos	41,6	0	22,2	33,3	16,6
	Inflamación	83,3	50	50	58,3	25
12 semanas	Estructura	44,4	5,5	77,7	44,4	29,6
	Columnas	50	5,5	77,7	66,6	38,8
	Celularidad	72,2	38,8	50	86,1	61,1
	Matriz	83,3	27,7	44,4	72,2	55,5
	Anillo pericondral	100	83,3	100	91,6	100
	Unión epífisis	50	66,6	75	58,3	75
	Unión metáfisis	100	83,3	100	58,3	83,3
	Puentes óseos	19,4	0	0	52,7	13,8
	Inflamación	50	50	25	16,6	75
24 semanas	Estructura	31,4	46,3	11,1	No estudiado	
	Columnas	30,5	5,5	5,5		
	Celularidad	77,7	30,5	47,2		
	Matriz	72,2	33,3	55,56		
	Anillo pericondral	100	100	100		
	Unión epífisis	66,6	58,3	33,3		
	Unión metáfisis	100	91,6	58,3		
	Puentes óseos	22,2	5,5	11,1		
	Inflamación	50	91,6	0		

Alteración moderada: Verde, porcentaje < 33,3 %

Alteración importante: Amarillo, porcentaje de 33,4 % a 66,6 %

Alteración intensa: Rojo, porcentaje > 66,7 %

Resultados

Las alteraciones mayores están en el anillo pericondral que es atrófico en todos los casos. La unión con la metáfisis tiene alteración intensa en la mayoría de los casos, la unión con la epífisis esta algo menos alterada y parece que disminuye la alteración en las valoraciones a tiempos mayores.

La matriz está claramente mas alterada en los casos que no recibieron tratamiento con células MSCs. La estructura, columnación y celularidad presenta también una mayor alteración en los casos no tratados con células MSCs, con la salvedad de los casos E15 en la valoración a las 12 semanas que han mostrado una alteración muy alta.

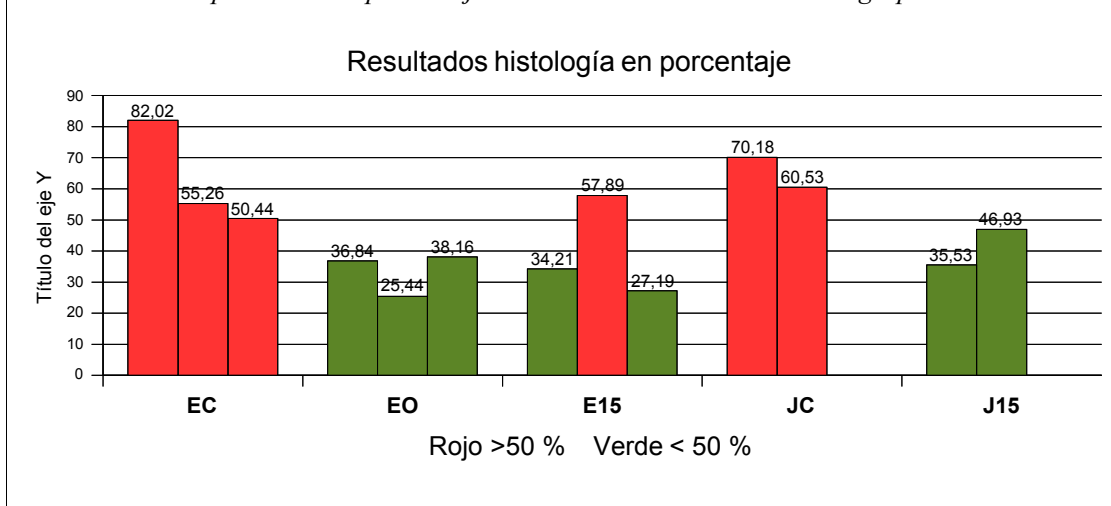
La formación de puentes óseos no son excesivamente intensos, tienen una tendencia a disminuir en los casos que se han sido tratados con células MSCs.

Tabla 5.6.15. Resumen de los porcentajes de alteración obtenidos por cada grupo y tiempo

Semanas	EC	E0	E15	JC	J15
6	82,02	36,84	34,21	70,18	35,53
12	55,26	25,44	57,89	60,53	46,93
24	50,44	38,16	27,19	-	-
Promedio	62,57	33,48	39,76	65,36	41,23

En la tabla 5.6.15, se indican los promedios de alteración obtenidos por cada grupo y tiempo de evaluación. Vemos que en los grupos tratados con células MSCs, con excepción del grupo E15 a las 12 semanas, el porcentaje de alteración tisular es inferior al 50%.

Ilustración 5.6.1: promedio del porcentaje de alteración obtenidos en cada grupo



6 Discusión

La primera pregunta que se ha planteado en este trabajo es:

¿Qué participación tienen, desde el punto de vista del fenotipo celular, la zona germinativa y la zona proliferativa en el desarrollo de la placa de crecimiento?

Para responder a esta pregunta se ha propuesto como objetivo estudiar en que medida las células de la zona del germinativo y del proliferativo participan en producir células de su propia zona y/o de la vecina.

Técnica de transiluminación

En primer lugar se planteó un problema de orden técnico, ¿cómo valorar de forma precoz los resultados sin producir artefactos en la placa de crecimiento?, lo que nos llevó a preguntarnos cómo es en realidad la arquitectura de la placa de crecimiento, a tenor de que sabemos que la imagen que tenemos tras los procesamientos habituales en histología se obtiene con un gran artefacto de la placa. También nos interesaba saber si podíamos valorar un corte en fresco de la placa de crecimiento previo al procesamiento histológico. Para resolver este problema se puso en marcha una técnica de visualización directa de la placa de crecimiento mediante transiluminación directa de la misma. Técnica que no hemos encontrado descrita en la literatura o al menos su aplicación a pesar de su gran simpleza.

La técnica de transiluminación directa de la placa de crecimiento nos mostró en primer lugar que las células, los condrocitos, de la placa de crecimiento son de morfología globular en toda la placa aunque con variaciones fenotípicas de su relieve celular según la zona de la placa. Así, se observó la distribución en columnas de células y como estas células se aplanan en la zona central de la placa correspondiente a la zona del proliferativo. Es decir se conservaba un patrón de arquitectura similar al descrito en histología convencional.

La valoración de la placa de crecimiento mediante esta técnica es aún compleja. Los resultados que presentamos tienen carácter de preliminares. Se observa bien la zona germinativa, con presencia de lagunas de condrocitos de forma esférica, unas con bordes lisos y otras con bordes irregulares, se observan procesos de citocinesis en zona germinativa y zona alta del proliferativo. En la zona del proliferativo se observan las células en columnas y aplanadas. En la zona hipertrófica se aprecia un aumento de la laguna. Encontramos problemas importantes en definir los elementos constitutivos de las lagunas, tales como las células; se identifican estructura esféricas y otras que no sabemos denominar.

Tras poner en marcha dicha técnica de transiluminación, y dado que en el planteamiento del trabajo describíamos las técnicas de mantenimiento de la placa de crecimiento en medio nutriente y de lesión traumática en la zona metafisaria para los trabajos de trasplantes diseñados, nos preguntamos en qué medida en la placa de crecimiento el número de condrocitos muertos (valorados con técnica de azul tripán) se modificaba según el tiempo de permanencia en el nutriente, o según el tiempo de evolución precoz de la lesión metafisaria. Obtuvimos las dos respuestas, los condrocitos de la placa no aumentan la mortalidad en la primera situación, y sí aumenta la mortalidad cuando se lesiona la metáfisis. La primera respuesta fue útil para valorar los tiempos previos al trasplante de placa y los comportamientos iniciales en los cultivos a realizar. La segunda respuesta nos orientó en el sentido de poner en marcha técnicas de estimulación de la placa de crecimiento tras el trasplante, en el que necesariamente había de lesionar la zona metafisaria del hueso, así como la posibilidad de conservar la zona metafisaria con la placa de crecimiento en otro grupo de trasplantes.

La técnica de transiluminación se ha usado a lo largo de este trabajo para valorar resultados de técnicas de cultivo *in vitro* y *ex vivo* según discutiremos más tarde, siempre seguidas de técnicas de histología convencional. Sin embargo entendemos que debemos ser muy críticos con la técnica de transiluminación. Si bien nos ha ayudado en dar los primeros pasos del trabajo, es una técnica no validada aún, por lo que carece, en estricto rigor, del valor que debe de tener en el tipo de estudio que presentamos. En la actualidad esta técnica se encuentra en curso de validación en nuestro laboratorio, mediante su contrastación con otras técnicas de tinción ya conocidas.

A pesar de todo, mediante la técnica de transiluminación al aplicar la tinción de azul tripán se ha observado que el porcentaje de células azul tripán positivas no se correlaciona con el porcentaje de células en apoptosis en la misma región de la placa. El porcentaje de células en apoptosis en placa de crecimiento se conocía previamente por el trabajo de Martos-Rodriguez et al (2003). La técnica de azul tripán la conocemos por ser el azul tripán un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan rotura en la membrana. La técnica de TUNEL, para estudiar apoptosis, la conocemos por estudiar la ruptura de DNA en unas secuencias de nucleótidos determinadas. Ambas técnicas valoran el resultado final de la célula, la célula muerta. Y ambas técnicas implican un proceso de muerte celular diferente, la técnica de azul tripán mediante un proceso de ruptura de membrana, y la técnica de TUNEL indicativa de un proceso de muerte celular programada como suele considerarse. ¿Qué significa la disociación de los resultados en los condrocitos de la placa de crecimiento? ¿Sugiere que en los condrocitos hipertróficos, con TUNEL positivo, existe diferente comportamiento en la membrana celular? No sabemos responder a estas preguntas en el momento actual.

Relación entre zona germinativa y zona proliferativa

A continuación analizamos la respuesta a la primera hipótesis planteada. Se analiza la relación entre la zona germinativa y la zona proliferativa de la placa de crecimiento. En un ensayo en el que se trata de estudiar el efecto de las MSCs en un trasplante osteocondral y en particular la placa de crecimiento, preguntarse sobre los problemas de influencia de dos zonas de la placa de crecimiento puede parecer en un principio fuera de contexto, puesto que los tipos de ensayo que se proponen son muy diferentes. Ahora bien, si consideramos que la placa de crecimiento se define, entre otros caracteres por la arquitectura columnar de sus células, hecho que implica una polaridad celular, se entiende que la conservación de la polaridad celular de la placa es fundamental para el buen funcionamiento de la misma.

En nuestro laboratorio se ha tenido la oportunidad de observar que la alteración de la polaridad en un tejido osteocondral, como es el anillo pericondral, puede dar lugar a anomalías del desarrollo y producir lesiones semejantes a un tumor benigno del cartílago (Delgado-Baeza et al.1987). Esta polaridad de la placa de crecimiento va a depender de la relación funcional de la zona germinativa y proliferativa. Entre los múltiples problemas que nos encontramos en la actualidad uno de ellos es que aún se desconoce la función de la zona germinativa. Los resultados del presente trabajo muestran que la zona germinativa aislada, cultivada sola *in vitro*, es capaz de generar células de la zona proliferativa; y que la zona proliferativa aislada y cultivada en condiciones similares es capaz de generar células de la zona germinativa. En ningún ensayo se ha observado que una zona a otra se regeneren de forma completa y la polarización celular es incompleta. Y tras los cultivos de ambas zonas de forma independiente (es decir colocadas en diferentes pocillos de cultivo) no se aprecia una modificación significativa del tamaño del tejido cultivado.

Sin embargo, cuando ambas zonas han sido aisladas y se cultivan *in vitro* juntas, en el mismo pocillo, se observa:

- a) que la zona de tejido cultivado correspondiente a la zona del proliferativo, genera zona de germinativo y además la pieza de tejido cultivada aumenta de tamaño, y se genera una polarización de la arquitectura tisular, aunque no se forman columnas completas, y estas se encuentran mal trabadas. El aumento de la zona proliferativa, co-cultivada, sugiere que necesita señales de la zona germinativa.
- b) En la pieza que corresponde a la zona del germinativo se observa que genera zona del proliferativo, que esta aumenta de tamaño, y además genera en su región central una invaginación en forma de botella, con un contenido celular de condrocitos fuera de sus lagunas, lagunas siempre próximas a la pared de esta invaginación.

Estos resultados sugieren que tanto la zona del germinativo como la zona del

Discusión

proliferativo tienen cierta potencialidad de crecer en cultivos, pero las señales celulares que cada zona tiene no son suficientes para regenerarse por sí mismas, al menos esto parece, y necesitan señales una zona de la otra. Resultados similares se han obtenido con los cultivos en cápsula renal.

Nos ha parecido muy significativo el resultado observado en b), por la imagen de invaginación observada en la zona germinativa. La imagen de invaginación que se ha observado es semejante a la obtenida en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio (Delgado-Baeza et al. 1992a). Esta imagen es similar a la invaginación que se produce en la condroepífisis para la formación del canal condral, en la condroepífisis proximal de la tibia de rata, previa a la formación del centro de osificación secundario (Delgado-Baeza et al. 1991; Delgado Baeza et al. 1992b). ¿Qué significado tiene esta observación? ¿Qué señales y cuáles son las moléculas de señalización celular que se producen entre la zona germinativa y la zona proliferativa? Lo desconocemos, por el momento no podemos responder a estas preguntas, que nos sugieren futuros estudios.

Si bien el estudio de las moléculas de señalización celular se sale, por el momento, fuera del alcance de este trabajo sí nos hemos aproximado al estudio *in vivo* del problema de las funciones de estas zonas. Cuando se reseca la zona germinativa se aprecia en la región central de la placa de crecimiento una desorganización de la zona del proliferativo, no se observan columnas organizadas, y en su lugar aparecen grupos de condrocitos desorganizados, en este aspecto nuestros resultados son concordantes con los de la literatura (Abad et al. 2002). Sin embargo, ha llamado la atención la recuperación del germinativo en las zonas laterales de la placa de crecimiento. La aparición de la zona del germinativo en las zonas laterales de la placa de crecimiento está en relación directa con un aumento del tamaño de la Zona Marginal de la placa de crecimiento situada en ambos lados, e incluso se aprecia que la zona del germinativo neo-formada tiene una prolongación directa con la zona marginal. En la actualidad la zona marginal situada en los extremos y por encima de la placa de crecimiento es una zona poco conocida. Es una zona que a modo de “donut” se sitúa en los márgenes de la placa. Hay que ser críticos con los resultados valorados en este ensayo, pues carecemos aún de estudios sobre la zona marginal de la placa de crecimiento.

Se ha observado que la zona germinativa se genera de una forma pobre por células procedentes de la zona del proliferativo, como se ha observado en los ensayos de interposición de membrana. Sin embargo cuando la zona proliferativa es tratada con sobrenadante de cultivos de condrocitos la zona germinativa regenera. Lo que nos dice que la zona proliferativa necesita unas moléculas de señalización celular para generar la propia zona proliferativa y la zona germinativa. Con ello mantenemos las preguntas planteadas con anterioridad.

Para algunos autores la zona germinativa toma un papel predominante en el desarrollo de la placa de crecimiento (Abad et al. 1999), sugiriendo que es la responsable del desarrollo

de la placa de crecimiento. Esta autora invierte *in vivo* la placa de crecimiento sin excluir la presencia de moléculas de señalización celular de otros tejidos próximos, incluida la misma placa de la que en ocasiones conserva regiones completas. Para otros, es la zona proliferativa la responsable del crecimiento de la placa (Horton et al.2006). Estos autores producen una lesión por radiación de la placa de crecimiento, sin poder testificar que queda zona del germinativo residual. A tenor de los resultados de este trabajo, se sugiere que las dos zonas se necesitan de forma cooperativa para el correcto desarrollo de la placa de crecimiento.

Trasplante osteocondral

Uno de los problemas durante el planteamiento del trabajo era si al realizar el trasplante de placa de crecimiento se conservaba o no el anillo pericondral en los ensayos. Los injertos de placa de crecimiento con anillo pericondral en cápsula renal nos mostró que, en dicha situación, la placa además de crecer conservaba la arquitectura normal. Mientras que los cultivos de placa de crecimiento sin anillo, mostraban que la placa crecía pero se perdía la arquitectura tisular de la placa. Estos resultados nos condujeron a respetar el anillo pericondral en los trasplantes.

Análisis de los resultados de trasplantes de placa de crecimiento. En la literatura revisada, previa y durante la realización del trabajo, no se ha encontrado otro trabajo con planteamiento similar al aquí realizado, por lo que se comentarán nuestros resultados. El tipo de trasplante de placa de crecimiento realizado en el presente trabajo ha sido un trasplante alogénico, ortotópico y avascular de la fisis distal del radio. Siempre el donante ha sido macho y el receptor hembra, todos de la misma edad inicial. En un grupo se ha realizado trasplante solo de la placa de crecimiento, en otro se ha realizado el trasplante de la placa con hueso metafisario. En un grupo se ha administrado MSCs y en otros no. A su vez estos casos se han valorado en distintos periodos de tiempo. La valoración de los resultados es compleja por distintos factores que influyen en el ensayo.

La extracción de la placa de crecimiento del donante se realiza mediante un acto quirúrgico que debe de ser muy delicado. La placa de crecimiento tiene una consistencia gelatinosa y una cirugía de extracción agresiva la puede lesionar. Igual ocurre cuando se extrae la placa con hueso metafisario. Durante el primer mes de vida de la rata las corticales de los huesos no tienen la consistencia dura del adulto, tienen una consistencia casi fibro-membranosa y una cirugía agresiva puede dañar la metáfisis y la placa de crecimiento.

La cirugía del receptor es también muy delicada, es necesario primero asegurarse que la extracción de la placa del receptor se extrae en un solo tiempo y completa. La lesión de la placa o una extracción dudosa obliga a rechazar el lecho, por la posibilidad de que queden restos de placa del receptor y confunda los resultados. El lecho del receptor ha de estar

adaptado a la morfología de la placa del donante tras la resección. Aunque el injerto sea ortotópico (mismo lado) y avascular, hay que procurar que los bordes de las secciones del lecho sean lo más homogéneas posible. Es muy importante conservar siempre la orientación de la placa de crecimiento, con o sin metáfisis ósea, distinguiendo siempre su plano distal que se corresponde con la condroepífisis y el plano metafisario, la colocación invertida de la placa conduce a un fracaso. Al finalizar la intervención es necesario colocar una férula de plástico, durante una semana al menos para dar estabilidad al lecho, el no hacerlo aumenta la presencia de mano zamba por la inestabilidad de lecho y sus repercusiones en la consolidación de las fracturas producidas.

La administración de MSCs la hemos realizado con células procedentes tanto de distintas de ratas como de distintos cultivos; asumiendo una homogeneidad de la médula de las ratas, una homogeneidad de los cultivos y homogeneidad incluso en un mismo cultivo. Así mismo nuestros resultados están en función de una dosis única de células. A tenor de los resultados obtenidos en el presente trabajo, resultados muy sugerentes y nada esperados, el hecho de asumir homogeneidad en los cultivos, tanto entre placas de cultivos como en las mismas placas es hoy objeto de crítica. Crítica porque los resultados que se están obteniendo en la literatura de las distintas investigaciones aportan datos para indicar que tanto en las placas de cultivos como en una misma placa existe heterogeneidad celular, que puede tener importantes implicaciones en los resultados. Aunque, también se reconoce en la literatura las dificultades técnicas existentes en la tipificación celular del cultivo.

En cuanto a la dosis de MSCs, si partimos de la base que estas células son portadoras de biofactores, es obvio que la cantidad de biofactores liberados por las células depende también del número de células. Por las características del trabajo nos hemos centrado en una dosis única de MSCs. Sin embargo, sí hemos establecido dos tiempos diferentes de administración, momento inicial del ensayo y dos semanas más tarde, aspecto poco comentado en la literatura pero que aporta resultados diferentes según hemos observado. Un aspecto que también se ha de considerar es la vía de administración. En un trabajo previo, no publicado, realizado en nuestro laboratorio administramos MSCs por vía intraósea directa, dado el tamaño de los hueso de rata se obtenía una respuesta mixta, la de las células y la de la agresión quirúrgica, por lo que esta ruta de administración fue rechazada.

Un aspecto que interesa en este trabajo concerniente a la valoración de la respuesta, es tener en cuenta la respuesta específica de especie y la respuesta específica del individuo sometido a tratamiento, y en este último caso tener también en consideración el tiempo de evaluación post-ensayo. Normalmente en los ensayos en grupos de animales distribuidos por tiempo se tiende a realizar una valoración secuencial de los resultados, según la cual existe o debe existir una concatenación de los datos. De tal forma que tanto de una evaluación positiva como negativa se hace de ella un valor esperado en la hipotética curva trazada con los resultados. Debido a las diferentes variables que se presentan en nuestro ensayo no se puede realizar una lectura lineal de los resultados.

Análisis Radiológico

Análisis de radiología de los ensayos. Uno de los aspectos que se ha encontrado en nuestro trabajo es la aparente disociación entre los resultados clínicos, radiológicos y los resultados histológicos. La valoración clínica de los resultados en el trabajo actual han mostrado en primer lugar una gran disminución de la aparición de mano zamba en la rata, con respecto al trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio (Fuster, 2004). Este hecho se debe a que la colocación de una férula de plástico en la extremidad superior intervenida de la rata ha eliminado las secuelas de complicaciones mecánicas habidas en la extremidad. Así se ha observado que en los periodos iniciales y finales de los grupos EC (control trasplante simple de placa), E0 (trasplante de placa + MSCs inicial) y E15 (similar al anterior, + MSCs a los quince días) y final de J15 (trasplante de placa con metáfisis + MSCs a los 15 días) apenas se haya observado manos zambas en las ratas. Como se observa, este tipo de respuesta es independiente de la administración de MSCs o del tipo de cirugía aplicado.

En el análisis radiológico se ha encontrado también cierta heterogeneidad de respuesta con respecto al tratamiento con MSCs así como con respecto al tipo de cirugía aplicado (trasplante de placa única o trasplante de placa con metáfisis). El acortamiento de la longitud del radio ha sido una constante en casi todos los grupos, junto con el acortamiento de la longitud del cúbito. En los únicos grupos donde este acortamiento no ha sido significativo ha sido en E0.3 y E15.1. En estos dos grupos es donde menos manos zambas se han observado. En el resto de los grupos si el acortamiento de ambos huesos es homogéneo y no hay diferencia de distancia entre las placas de crecimiento del cúbito y del radio (lo que hemos tipificado como fisis *minus* o *plus*) no tienen porque aparecer manos zambas.

El acortamiento del radio en todos los grupos ha sido a costa del segmento distal del radio, hecho que cabía esperar pues la placa de crecimiento distal del radio es responsable del crecimiento de este sector del radio. En el grupo control sin MSCs, llama la atención que frente a los resultados catastróficos que cabía esperar estos no han sido así. Y en algunos parámetros, que son de importante repercusión en el curso evolutivo del trasplante, como aquellos que hacen referencia al tamaño radiológico de la placa de crecimiento no hay cambios significativos, aunque si es evidente que en las doce semanas de evolución se ha observado un acortamiento de la placa de crecimiento así como los parámetros de la medida de la epífisis del radio. El acortamiento radiológico de la placa se ha observado también en los grupos JC y J15 (ensayos de trasplante de placa con metáfisis, grupo control y grupo con células administradas a los 15 días), sin embargo en estos dos últimos grupos no se han observado defectos de crecimiento de la epífisis del radio, aspecto de gran importancia para mantener la congruencia radiocubital distal. ¿Cuál es la causa de la conservación normal de las medidas de la epífisis distal del radio? Por el momento no podemos responder, se puede sugerir que la alineación post-operatoria mantenida con la férula en la extremidad tiene gran

Discusión

influencia. Si observamos los ensayos en los cuales se ha trasplantado la placa con metáfisis ósea vemos que cursan con discreto acortamiento radiológico de la placa o con no acortamiento de la misma, con no modificaciones significativas de la epífisis del radio y con buena alineación de la extremidad.

Los ensayos de los grupos E0 y E15, ensayos de trasplantes sólo de placa de crecimiento con administración de células en el momento inicial post-trasplante o a los 15 días del trasplante, son los que han dado un resultado diferente. El acortamiento del cúbito y radio ha ocurrido en ambos grupos, incluso con mayor acortamiento que en los otros grupos de ensayo. Pero ha llamado más la atención la longitud radiológica de la placa de crecimiento que ha aumentado a las doce semanas de evolución del trasplante (en el periodo inicial y final no hay cambios significativos), este cambio se acompaña de un mayor tamaño de la epífisis del radio en todos los grupos. Este crecimiento ha sido más exuberante en el grupo E0 de 12 semanas, con placas que han alcanzado una medida radiológica de hasta 4 mm de longitud, con crecimiento también profuso de la anchura de la placa. El crecimiento mayor de la epífisis del radio con respecto al grupo control quizá se pueda explicar por el hecho de que la epífisis tiene un patrón vascular independiente, y si sabemos que tras la lesión quirúrgica se produce una estimulación de la vascularización esta puede afectar favorablemente a la epífisis del radio. Además hay que tener en cuenta que la epífisis del radio se encuentra unida al cúbito en la región distal, participando en la articulación radiocubital distal. Esto ayuda a entender, que cuando la epífisis del radio compensa un determinado defecto de crecimiento y mantiene la congruencia de la articulación radiocubital, no haya predominancia de lesiones tales como luxaciones o subluxaciones de la articulación radiocarpiana como hubiera sido de esperar, y la subsiguiente aparición de mano zamba.

Hasta el momento sólo se puede sugerir que la inmovilización de la extremidad después de realizar el trasplante de placa de crecimiento favorece el curso clínico de la evolución del trasplante, y que la administración de MSCs tanto inicial como a los quince días del ensayo favorece una imagen de buena alineación de la extremidad y sugere de crecimiento de la placa.

Análisis Histológico

Análisis de la histología de los ensayos. El análisis de nuestros resultados muestra que existe una disociación de los mismos con respecto al tiempo. Los resultados en distintos tiempos no traducen una secuencia de comportamiento de la respuesta de la placa de crecimiento. Hemos observado que los peores resultados se tienen en los grupos controles EC (trasplante único de placa) y en el periodo inicial de JC (trasplante de placa más metáfisis). En

los grupos en los que se ha administrado MSCs se obtienen resultados más satisfactorios, con algunas diferencias. Cuando se ha realizado el trasplante de placa de crecimiento administrando las MSCs en el periodo inicial se ha obtenido mejor resultado en el análisis histológico normal a las 24 semanas que con el grupo de células administradas a los 15 días de la intervención. Sin embargo, en la primera situación, la administración de MSCs en el día inicial del ensayo, da lugar a una respuesta celular de carácter inmunológico muy abundante, con un gran predominio de células plasmáticas, estas células bordean la placa en algunos casos en todo su perímetro. Sin embargo, cuando se administran las MSCs a los 15 días post-trasplante de placa de crecimiento no se observa una repuesta celular de la misma magnitud, todo lo contrario esta aparece muy larvada. Esta primera evaluación nos lleva a sugerir que los mejores resultados se obtienen cuando las células se administran un tiempo después de la agresión quirúrgica.

¿Porqué ocurre esta mejor respuesta a los 15 días? No lo sabemos. Se puede sugerir que en la actualidad sabemos que tras una lesión ósea se ponen en marcha más de mil genes, como se ha comprobado en estudios de *microarray*, y podemos sugerir que la información que llega a las MSCs en el periodo inicial es de tal carácter que debe de inducir un estado de *confusión celular*. Cuando se puso en marcha el presente trabajo, en la revisión bibliográfica realizada, se informaba sobre algunos aspectos inmunológicos de estas células, el mismo Caplan ha insistido en numerosos trabajos sobre el carácter de estas células de presentar una sombra inmunológica, es decir son células no propensas a estimular una respuesta inmunológica por parte del huésped. Interpretamos que tiempo después del trasplante cuando la respuesta a la agresión quirúrgica se ha silenciado, al introducir las MSCs estas células reciben de forma única las señales que, de alguna forma que desconocemos, emite la placa de crecimiento.

A pesar de que el efecto de inmunomodulación de las MSCs se considera benéfico en el tratamiento del rechazo de alotrasplantes (Le Blanc y Ringdén, 2008). Recientemente se ha observado que las MSCs, revisadas en el contexto de la inmunología, muestran un comportamiento bimodal, i.e. tiene una respuesta inmune anti-inflamatoria y otra respuesta potenciando el efecto inflamatorio. En su acción bimodal, las MSCs también regulan la producción de anticuerpos por las células B, producen alteraciones en los subtipos de células T (Patel et al. 2008). Quizá ello pueda justificar la respuestas que hemos observado en nuestro ensayo, aunque desconocemos los mecanismos intrínsecos de las mismas.

Sugerimos que la placa de crecimiento emite algún tipo de señal. La mayor parte de los trabajos, sugieren un comportamiento plástico de las MSCs, esto quiere decir que las células van al lugar de lesión y ejercen un efecto reparativo de la lesión, mediante un fenómeno de diferenciación celular. Sin embargo, los resultados de estas publicaciones han sido discutidos y criticados por Caplan (2006). También hoy sabemos que estudios en los que se evaluaba mediante marcaje, tinción e incluso cromosoma Y, las células introducidas en el receptor, en los resultados de la evaluación final, lo que recogían eran quimeras producidas entre las células del donante y las células del receptor. En estudios de hibridación *in situ*

realizados en nuestro laboratorio no se han observado señales positivas del cromosoma Y en momento alguno, en las zonas próximas al trasplante. Esto nos ha llevado a la conclusión que las MSCs van a algún nicho, que desconocemos por el momento. En estudios previos en nuestro laboratorio no publicados se ha observado la localización de estas células en médula ósea. También, nos lleva a la conclusión que de algún modo se establece un diálogo con las moléculas de señalización celular entre las MSCs y la placa de crecimiento, que por el momento desconocemos.

El hecho de que el trasplante de placa de crecimiento realizado en este trabajo sea un trasplante avascular nos obliga a analizar cómo se nutre la placa de crecimiento. Por los trabajos de Brighton sabemos que la placa de crecimiento en mamíferos esta formada por un tejido cartilaginoso hialino, con metabolismo celular anaerobio, entre dos sistemas vasculares (no así en el pollo que está atravesada por canales); un sistema vascular epifisario que emite unos vasos que atraviesan la zona germinativa (que es avascular) y alcanzan la zona alta del proliferativo, con una alta pO_2 . Otro sistema vascular metafisario, que finaliza en la zona baja del hipertrófico, con baja pO_2 . En ninguna circunstancia la placa de crecimiento en mamíferos es atravesada por vasos. A este problema nos hemos aproximado en este trabajo analizando la morfología de las zonas de la placa en la unión de placa de crecimiento con la epífisis y la unión de la placa de crecimiento con la metafisis. Nuestros resultados aportan de forma genérica, incluido los grupos controles y ambos grupos de ensayo (trasplante de placa de crecimiento única y trasplante de placa de crecimiento con metafisis), que la zona de unión placa de crecimiento con la epífisis se realiza de forma aceptable en un 45% de los casos aproximadamente, mientras en la unión con la metafisis se realiza en un 20% aproximadamente. Aunque desconocemos las peculiaridades morfológicas más íntimas y las características funcionales de esta unión. Ha llamado la atención los resultados en el grupo E15 (MSCs administrada a los 15 días) a las 24 semanas de evolución, en el que la unión epifisaria se realiza en un 75%, y la metafisaria en un 40% aproximadamente. Esto nos sugiere preguntar en qué medida las MSCs pueden ser una fuente de VEGF. Puesto que no se han observado MSCs en dicha zona, y se sugiere algún tipo de comunicación de señales estas se deben realizar por vía paracrina. Por el momento desconocemos las causa de estos hallazgos.

Los cambios de la estructura de la placa de crecimiento, así como los cambios en las columnas celulares, celularidad y matriz extracelular siempre han sido menores, que los que cabría esperar en un trasplante de placa de crecimiento, en los casos en los que se ha administrado MSCs con respecto al placa de crecimiento control. Se ha observado, aunque no se ha cuantificado, un aumento de células en la zona del germinativo en la generalidad de los casos, así como la tendencia a respetar la arquitectura polarizada de la placa de crecimiento (formación de columnas en el proliferativo, etc.). Incluso, en los casos en que se ha administrado MSCs se ha observado una expansión de la placa de crecimiento que ha superado, en algunos casos, más de diez veces el tamaño original. Desconocemos la causas de esta lesión; podemos sugerir que estén en relación con las moléculas de señalización celular que también desconocemos. Podemos sugerir que una de las causas puede estar en

función de la capacidad de las MSCs de emitir señales de tipo Ihh, como discutiremos más adelante. Ha llamado la atención que en el grupo control de trasplante de placa de crecimiento se registre una tendencia a la recuperación de la placa de crecimiento en el periodo de 24 semanas, siempre dentro de los malos resultados de este grupo, sobre todo si se tiene en cuenta que la historia natural de este grupo es el fracaso del trasplante, como se sabe desde el trabajo de Ring (1955). Desconocemos las causas.

La aparición de puentes osteofibrosos es una complicación importante. El puente óseo, fibroso o mixto se produce por tejidos óseos o fibrosos que atraviesan la placa de crecimiento en un sentido vertical, desde el plano epifisario al plano metafisario, tanto en la zona central de la placa como en la zona periférica de la placa de crecimiento, estos últimos producen más daño lesional. La aparición de esta lesión rompe la arquitectura de la placa y afecta de forma importante a la función. Ha llamado la atención que en los grupos en los que se ha administrado MSCs disminuye en gran porcentaje la aparición de dicha lesión. En los ensayos EO y E15 (ambos ensayos con MSCs administradas en el día 0 y 15 de ensayo) hay cuatro grupos (en distintos tiempos) con nula presencia de puentes óseo/fibrosos; en el resto de los grupos con células los puentes óseo/fibrosos se presentan en menos del 15% de los casos, mientras que en los grupos controles se presentan en el 35% de los casos aproximadamente. Las causas normales de producción de un puente óseo, fibroso o mixto pueden ser por lesión traumática o por un proceso de muerte celular en la placa, en nuestro ensayo se podría también incluir una lesión o un mal cuidado de la placa previo al trasplante, circunstancia que se ha evitado en todo momento (en caso de daño de placa en la extracción o en la técnica de trasplante el caso ha sido rechazado). El bajo porcentaje de puentes en los casos que se ha administrado MSCs, nos sugiere una aceptable función celular, quizá por las razones expuestas en el párrafo anterior.

Finalmente, en el análisis de la estructura de la placa de crecimiento, nos encontramos con el anillo pericondral. El anillo pericondral es una estructura relativamente poco conocida, estructura en forma de banda que rodea a la placa de crecimiento. Es una estructura formada por dos grupos de células; un grupo de menor densidad celular cuya función aún se desconoce, esta zona se la denomina surco de Ranvier; y un grupo de células, osteoblastos, que forman una barra ósea, denominada barra ósea de Lacroix (Shapiro et al. 1977), que ejerce una función mecánica de sostén sobre la placa de crecimiento. En nuestros ensayos el anillo se ha encontrado atrofiado en 90% de los casos. Creemos que esto se debe a que el anillo pericondral está constituido por unas células de metabolismo aeróbico y que al verse lesionado en sus vasos no es capaz de regenerar, y más aún en la dificultad morfológica en que se presenta al estar todo el anillo cubierto por un tejido fibroso. Una de las consecuencias de este fallo del anillo lo encontraremos al discutir el grupo EO-de 12 semanas, en el que junto a una gran expansión de la placa en sentido longitudinal, se ha observado una expansión de la placa en anchura, casi en forma de campana, que achacamos a la ausencia de anillo pericondral quedando la placa de crecimiento sin soporte mecánico de sostén.

Análisis de casos especiales

Análisis casos especiales que se han observado en algunos grupos y que de alguna forma plantean unos de los problemas esenciales del presente trabajo. El interés de este trabajo se ha centrado en la respuesta histológica de aloinjerto de placa de crecimiento tratado con las MSCs. Los aspectos de la respuesta inmunológica encontrada a lo largo de este trabajo, dada una serie de implicaciones celulares que no han sido estudiadas así como datos analíticos que tampoco han sido estudiados, no son comentados en este trabajo; el comentario de los mismo obligaría a plantear una discusión completamente especulativa sin poder basarnos en datos empíricos concretos.

La aparición de la placa de crecimiento expandida descrita se observa únicamente en la placa de crecimiento trasplantada, prácticamente en todos los casos, y no en la placa de crecimiento del hueso vecino (en este caso el cúbito), esto sugiere que la respuesta de la placa de crecimiento a la administración de MSCs es local, solo de la placa de crecimiento trasplantada. Sin embargo, la intensidad de la respuesta sí la hemos observado dependiendo del tiempo, en el primer periodo de tiempo la placa trasplantada tratada con MSCs crece de forma más pronunciada que la placa control. Esta respuesta se hace más exuberante a las doce semanas de evolución, y disminuye discretamente con respecto al periodo anterior a las 24 semanas de evolución. En el presente trabajo, con el fin de ordenar la discusión sobre la placa de crecimiento, se han definido una serie de patrones de comportamiento histológico de la placa de crecimiento sobre la base de la conservación de la arquitectura tisular de la placa de crecimiento, patrones observados tras la valoración de los resultados puesto que no fueron previsibles su observación. Estos patrones se encuentran descritos en el apartado EO- 12 semanas en los Resultados. Se ha definido **Patrón A**, el tipo de placa de crecimiento que no muestra cambios arquitectónicos en su estructura, y corresponde a una placa de crecimiento normal. Se ha denominado **Patrón B**, a la placa de crecimiento que cursa con alteración catastrófica de su arquitectura, según describimos en el apartado Resultados. El **Patrón C**, se ha definido como una placa expandida, de gran tamaño.

El **Patrón C** ha sido el observado de forma más constante en todos los casos en los que se ha administrado MSCs, la intensidad de la respuesta ha sido independiente del momento de la administración pero sí dependiente del tiempo; ha sido exuberante a partir de las 12 semanas, encontrándose placas de crecimiento de unas tres mil micras de altura media. El comportamiento histológico del patrón C recuerda al raquitismo. En el raquitismo los condrocitos continúan hasta la maduración y alcanzan el estado de condrocitos hipertróficos, pero los condrocitos no pueden reabsorber las células hipertróficas, desde el momento en que el cartílago no está calcificado. No hay invasión vascular y no se forma hueso metafisario. La zona hipertrófica se encuentra muy expandida, pero no se encuentra calcificada. La expansión de la placa de crecimiento se observa en el estudio radiológico, y en la radiografía convencional se observa un aumento de la zona correspondiente a la placa de crecimiento (Iannotti et al. 2000). Esta observación se ha realizado en nuestros casos, en casi

todos los casos pero con distintos grados de intensidad según el periodo de estudio, y de forma más pronunciada en la serie EO-12 semanas, que se analizará a continuación, grupo que aprovechamos para unificar la discusión de los problemas encontrados.

Al raquitismo se puede llegar por varias causas: Por deficiencia de calcio (Long et al. 1984), por hipofosfatemia (Sabbagh et al. 2005; Svensson et al. 1984), o por defecto de vitamina D (Boyan et al. 2002). El hecho es que en nuestros resultados se ha encontrado que tras la administración de MSCs en ratas trasplantadas con placa de crecimiento se desarrolla un proceso similar al raquitismo. Un resultado como el que exponemos no ha sido comunicado en la literatura científica, hasta el momento de escribir este trabajo. La circunstancia de encontrarnos ante una entidad semejante al raquitismo hace que nos preguntemos: ¿De qué modo la administración de MSCs participa en este proceso? La respuesta no la conocemos. Dado que sí sabemos que el raquitismo por ausencia del receptor de vitamina D se produce por ausencia de un mecanismo de apoptosis en los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento (Donohue y Demay, 2002), presuponemos que las MSCs participan, de algún modo que aún desconocemos, en disminuir la apoptosis de los condrocitos hipertróficos. Este aspecto de la función de las MSCs es objeto en la actualidad de estudio en nuestro laboratorio, sin olvidar otros aspectos que se comentarán más tarde.

La regulación de la conversión de condrocitos con un fenotipo de pequeño tamaño al condrocito con un fenotipo hipertrófico es por lo tanto una mecanismo de control importante en la placa de crecimiento (Iannotti et al. 2000). Ihh producida por la diferenciación de los condrocitos, retrasa la diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento por estimulación de la síntesis de PTHrP pericondral, que actúa en el receptor PTH/PTHrP en los condrocitos (Lanske et al. 1996). PTH media el efecto de Ihh a través de la formación de un mecanismo de regulación negativa que modula el nivel de la diferenciación de condrocitos (Vortkamp et al. 1996). La alteración de esta ruta altera la diferenciación terminal de los condrocitos en la placa de crecimiento, el resultados es la aparición de distintas patologías esquelética, tales como las displasias óseas una de ellas es la Condrodisplasia Metafisaria de Jansen (Schipani y Provit 2003). En la displasia de Jansen la imagen radiológica es similar a la que se observa en el raquitismo con ensanchamiento de la zona hipertrófica (Iannotti et al. 2000).

Aún así, los mecanismos de regulación y actividad biológica de PTHrP, Ihh, BMPs y FGFs en la placa de crecimiento fetal son más complejos. Ihh induce la expresión PTHrP en la región articular, y PTHrP en cambio reprime la expresión de Ihh, generando un mecanismo de regulación negativa. Ihh también induce la expresión de BMP, que asimismo inducen la expresión de Ihh en un mecanismo de regulación positiva. Al contrario, FGFs reprime la expresión de Ihh. PTHrP, Ihh y BMPs son moduladores positivos de la proliferación, y afectan negativamente a la maduración; el efecto de Ihh sobre la maduración es exclusivamente dependiente de PTHrP, mientras Ihh induce proliferación independientemente de PTHrP; y el efecto de BMPs sobre la proliferación puede ocurrir independientemente del

eje PTHrP/Ihh. FGFs son reguladores negativos de la proliferación, y afecta positivamente la maduración terminal de los condrocitos; estos efectos pueden ocurrir independientemente de la acción PTHrP/Ihh. De nuevo nos preguntamos ¿de qué modo participan las MSCs en la lesión que describimos en nuestros resultados? No lo sabemos. Por trabajos previos en nuestro laboratorio sabemos que las MSCs, aisladas y expandidas en cultivos celulares expresan transcritos de la vía de señalización del eje Ih-PTHrP (Romero-Prado et al. 2006). Podríamos sugerir que las MSCs, en nuestro caso, alteran el eje PTHrP/Ihh. Pero dada la complejidad de actuación de las moléculas de señalización celular, como se ha referido anteriormente, no se puede descartar otra ruta, que también desconocemos.

En algunos casos como el que a continuación comentamos, caso E0.2.1 (06-317), se observó en el estudio histológico que la altura media de la placa de crecimiento del radio trasplantado era de 222 micras y la altura media de la placa de crecimiento (normal) del cúbito era de 183 micras. La placa de crecimiento del radio tenía una arquitectura aparentemente normal, se identifican las zonas germinativa, proliferativa e hipertrófica. También se observó pérdida del patrón celular normal de médula ósea; y en su lugar se observaron abundantes células monocelulares, histiocitos, células de la serie granulocítica, y células plasmáticas. Al analizar este caso, así como otros, se encontró que teníamos registrado que en el momento de la administración de las MSCs en la vena de la cola se había producido una extravasación. Lo cual nos sugiere que la intensidad de respuesta puede estar en función de la dosis administrada. La relación dosis/trasplante se ha considerado importante en la continuación de este trabajo que se realiza en nuestro laboratorio. Una respuesta semejante se ha encontrado con la respuesta inflamatoria del receptor, de tal forma que a menos dosis menor es la respuesta. Aunque estos nuevos aspectos del problema no lo hemos encontrado suficientemente estudiados en la literatura revisada.

En el **Patrón D** predominan cambios del fenotipo y de la polaridad de los condrocitos en la zona proliferativa. El eje de los condrocitos alterados cambia su orientación con respecto a la posición normal. El eje de la posición normal de los condrocitos ha sido descrito en la literatura (Buckwalter et al. 1985). Desconocemos el significado de estos cambios así como las causas de dicho cambio en el Patrón D.

En el análisis del **Patrón E**, nos referimos al caso E0.2.2, primero se considera pertinente comentar la imagen radiológica. La imagen radiológica que se observa corresponde a la radiolucencia de la placa de crecimiento, no es una zona lítica de lesión ósea. La calcificación en forma de punto que se describe en la imagen radiográfica corresponde a una imagen cortico-metáfisaria, aunque también se observa alguna imagen intralesional más radio-opaca. La imagen expandida de la radiografía corresponde a la placa de crecimiento y se acompaña de un discreto ensanchamiento de la metáfisis. Ante una imagen de estas características se podría sugerir estar presente ante una lesión de displasia ósea, tipo encondroma, o bien ante una lesión de distrofia ósea tipo raquitismo. Otras lesiones de condrodisplásias de tipo congénito, como las descritas más arriba, y otras lesiones tumorales condrales han sido descartadas por las características del ensayo.

Previa a cualquier consideración diagnóstica descartamos la presencia de un callo de fractura, de tipo cartilaginoso, forma de callo muy frecuente en la rata, porque el callo cartilaginoso, sobre todo en animales, algunas veces se puede confundir con un tumor maligno, tipo condrosarcoma (Long y Leiniger 1999). También se han descartado algunas lesiones benignas conocidas por su capacidad de sufrir una transformación maligna, como encondroma, condroblastoma y otras con menor posibilidad de localizarse en esta región. (Hajdu, 1986).

No se observaron criterios histo-patológicos para incluir el Patrón E en el grupo de la lesión tipificada como “nódulo de cartilago displásico”, normalmente asociado a un tumor benigno denominado encondroma o bien asociado a la enfermedad de Ollier (Brien et al. 1997). El foco de lesión sugiere una displasia “*in situ*”. Displasia es un término impreciso. Este término se suele usar para denominar lesiones situadas entre hiperplasia y la neoplasia. De acuerdo con las teorías vigentes de carcinogénesis, existe y se admite un término entre ambas lesiones (Majno y Joris, 2004). La displasia en una superficie epitelial que acaba en cambios que es definitivamente neoplásico recibe el nombre de carcinoma *in situ* (Majno y Joris, 2004). En el tejido conectivo una lesión con las mismas peculiaridades se ha descrito con el termino “sarcoma *in situ*” (Hajdu, 1986), sin embargo esta expresión es poco usada en clínica.

En un principio éramos conscientes que “la tendencia a confiar en la histología como una guía del diagnóstico puede conducir a un desastre” (Mirra, 1980). Así como que “el diagnóstico debería representar una síntesis de todos los datos posibles (biológicos, clínicos, etc, no solamente una lectura del porta” (Mirra, 1980). Pero las características del estudio experimental no hacían sospechar en momento alguno el presente hallazgo, que además no se ha vuelto a encontrar en otro caso.

La combinación de criterios titulares y celulares hizo pensar que nos encontrábamos ante una lesión semejante a un condrosarcoma bien diferenciado siguiendo la terminología propuesta por Hajdu (1986), “*a well-differentiated chondrosarcoma-“borderline”-like*”. Para este autor esta denominación significa una lesión al borde de lo tumoral y que como tal muestra cambios estructurales precoces. Aunque el uso del término condrosarcoma, usual en la clínica humana, presenta en ocasiones cierta dificultad de aplicarla a ratas por la diferente heterogeneidad de estos tumores en ratas.

La aceptación del diagnóstico de esta lesión como condrosarcoma ha sido objeto de discusión en nuestro laboratorio con otros profesionales (patólogos unos y otro un profesional con experiencia en patología general y aparato locomotor). Mi formación como farmacéutica me ha hecho recabar la colaboración médica es este tema y otros temas del presente trabajo. Tras discusión previa, se decidió en nuestro laboratorio aceptar la presencia de una displasia focal, displasia *in situ*, lo que conducía a quedarse en este diagnóstico, o decantarse hacia el condrosarcoma bien diferenciado. La displasia *in situ*, de por sí implica lesión tumoral. La lectura del comportamiento celular del foco de lesión, incluida la técnica de inmunohistoquímica y observar células BrdU+ decantó el diagnóstico hacia condrosarcoma

bien diferenciado.

Ayuda a orientar el diagnóstico, la presentación de la lesión como “un foco, que al principio puede representar únicamente una pequeña porción del propio tumor” y el hecho que “los cambios malignos en el cartílago benigno tienen lugar mediante cambios lentos, casi en una gradación insensible” (Mirra, 1980), así como la presencia de pleomorfismo del núcleo y citoplasma, anaplasia celular, aumento del tamaño de los núcleos, aumento del número de nucleolos, presencia de células BdrU + (en los condrosarcomas las mitosis no son frecuentes).

La observación de una matriz extracelular de carácter basófilo que separa las células del tumor sin definir una formación de lagunas de condrocitos, nos hizo pensar que se podría tratar de una lesión semejante a un condrosarcoma mixoide, “*myxoid chondrosarcoma-like*” (Huvs, 1977). Aunque, se ha descrito que los condrosarcomas son tumores heterogéneos en el comportamiento histológico y pueden estar compuestos de tejido condroide, áreas mixoides y anaplásica así como con septos fibrosos (Sönderström et al. 2002). Lamentablemente desconocemos el comportamiento biológico de esta lesión, en el presente ensayo, que sería de gran ayuda en su diagnóstico, debido entre otras razones por ser una lesión no esperada y no se presuponía su aparición. Aunque, también sabemos que el resultado histológico y el biológico no siempre van paralelos (Gilmer et al. 1963).

La imagen del foco de displasia focal que aparece se insinúa entre las células de la zona del germinativo y proliferativo hasta finalizar en un grupo celular con anaplasia y pleomorfismo celular incita a discutir el problema del origen del condrosarcoma (CS). Brien, Mirra and Kerr (1997) sugieren una interesante consideración teórica en su artículo. Estos autores escriben que “el hecho de que el CS es una masa simple implica que se desarrolla de una transformación maligna de otra masa simple, anteriormente benigna o “displástica” o de un tipo celular pre-maligno. La cuestión que queda sin resolver es cuál fue la célula benigna original”. Ellos proponen dos teorías. Primera, si proceden de células troncales de hueso o de cartílago no precursoras (en el sentido de no agregadas, “uncommitted”) entonces el concepto de CS primario es válido”. La segunda teoría, consiste en que el denominado CS primario puede, en la mayoría de las veces, ser un CS secundario en el que la evidencia de una lesión precursora benigna se ha destruido por una proliferación maligna”. Los autores optan por esta segunda teoría. En el presente caso hemos observado que en el Patrón E, los cambios celulares descritos se encuentran en una “*insensible gradation*” con respecto a células germinativas/proliferativas, comprometidas en la condrogénesis, de la placa de crecimiento. Si además tenemos en consideración los resultados de Sönderström et al. (2002); estos autores muestran un aumento de la expresión de SOX-9 y de colágeno tipo IIA en condrosarcomas, y sugieren que este tumor procede de células multipotentes comprometidas en la diferenciación a lo largo de la vía condrogénica. La especulación sobre estos aspectos nos llevaría a asumir la primera teoría. Sin embargo, cabría preguntarse si las células de la zona de germinativo y proliferativo son multipotentes. Para algunos autores las células de la zona del proliferativo son verdaderas células troncales. La siguiente pregunta sería: ¿Bajo qué condiciones en una zona de cartílago normal puede aparecer una displasia focal? En las condiciones anteriores, de

displasia condral, ¿ qué papel juegan las MSCs?

Se sabe que los condrosarcomas pueden ocurrir a través de una transformación metaplásica de células no tumorales (Long y Leiniger, 1999). Se acepta que la metaplasia, donde la transdiferenciación ocurre, consiste en la conversión de una célula diferenciada en otra (Slack y Tosh, 2001). La transdiferenciación significa un cambio en el fenotipo de una célula que adquiere un nuevo estado estable de comportamiento (Beresford 1990). No toda metaplasia representa la transformación de un tejido que es por sí mismo normal, y muchos de los estados finales son tejidos atípicos o displásicos (Tosh y Slack 2002). Se sabe que los procesos de transdiferenciación necesitan moléculas de señalización celular, la cuestión es cuáles de estas moléculas inducen transdiferenciación (Tosh y Slack 2002).

Se ha descrito que las señales Ihh se encuentran activas en el condrosarcoma y en tumores cartilagosos benignos y que el sistema inhibitorio de control de las señales de PTHrP sobre Ihh está ausente (Tiet et al. 2006). Estos autores, encuentran que la señalización mediada por Ihh era constitutivamente activa tanto en condrosarcomas como en encondromas. Estos hallazgos sugieren, a estos autores, que la señalización Ihhh no es responsable de la transformación maligna pero juega un papel importante en la tumorigénesis manteniendo las células tumorales en un estado proliferativo aunque menos diferenciado. Se ha demostrado que los ligandos *hedgehog* segregados por las células estromales de la médula ósea funcionan como factores de sobrevivencia para algunos tumores malignos (Dierks et al. 2007). También se ha sugerido que las MSCs segregan factores bioactivos que pueden estimular la mitosis de células troncales o progenitoras intrínsecas de los tejidos (Caplan 2006). ¿De qué manera estos factores bioactivos pueden producir unos cambios focales displásicos del cartílago? Por el momento no podemos responder a esta pregunta. Estos biofactores pueden depender del tipo de célula que se genere en el cultivo. Esto nos obliga a preguntarnos sobre el problema del tipo de diferenciación celular, alteraciones y subpoblaciones celulares en un cultivo *in vitro* como ha sido sugerido por algunos autores (Wagner y Ho, 2007). En la reciente revisión de Patel et al. 2008, comunican que las MSCs no sólo poseen propiedades tumorigénicas intrínsecas, sino que inducen a poseer esta propiedad tumorigénica.

Cabría plantear la pregunta ¿Las MSCs actúan en función de una actividad plástica, sustituyendo, reemplazando o diferenciándose en células del lecho lesionado, o ejercen su función a través de moléculas de señalización, mediante una función trófica preconizada por Caplan (2006)? Caplan (2006), tras una revisión de casos clínicos (infarto cerebral, cardiopatías, lesiones meniscales) en los que se has administrado MSCs concluye: En el lugar de la lesión las MSCs inhiben la fibrosis de la cicatriz, promueven la angiogénesis y estimulan, en menor grado, la división y diferenciación celular en el lecho. Sin embargo, la función de plasticidad de las células madre es preconizada por casi la totalidad de los trabajos existentes en la literatura, y con esa intencionalidad se aplica en clínica. A tenor de nuestros resultados, sugerimos que las MSCs ejercen su función, no por su actividad plástica sino por su actividad funcional. Pensamos que la estructura lesionada, en nuestro caso la placa de

crecimiento afectada de algún modo, que desconocemos, emite unas moléculas de señalización (que se desconocen) que reciben las MSCs; y la MSCs responden con moléculas de señalización, que también desconocemos. En nuestros ensayos, una estructura como la placa de crecimiento normal no se ha observado que responda a las señales de las MSCs. La capacidad de plasticidad de las MSCs siguen siendo objeto de estudio, aunque lo que se extrae de Jiang et al. (2002) siguen siendo muy concluyente. Estos autores inyectaron MSCs en blastocitos y observaron la producción de endotelio, endodermo y ectodermo; pero tanto los fenómenos de quimerismo como la capacidad de las MSCs de producir proliferación y diferenciación en el lecho les hicieron ser críticos con los resultados

A tenor de nuestros resultados, sugerimos que las MSCs ejercen su función, no por su actividad plástica sino por su actividad funcional. Pensamos que la estructura lesionada, en nuestro caso la placa de crecimiento afectada de algún modo, que desconocemos, emite unas moléculas de señalización (que se desconocen) que reciben las MSCs; y la MSCs responden con moléculas de señalización, que también desconocemos. En nuestros ensayos, una estructura normal, como la placa de crecimiento normal del hueso adyacente – en nuestro caso el cúbito – en ningún caso responde de forma alguna a las señales de las MSCs.

Otro problema que parece importante es ¿cuándo administrar las células MSCs, en el momento inicial del ensayo o quince días tras el ensayo? Este es un problema poco estudiado en la actualidad. El grupo de Schenk et al. (2007) demuestran que las MSCs administradas un día después de la lesión cardiaca, anidan en el lecho cardiaco, en un número significativo de células por unidad de superficie, mientras que las MSCs administradas a los catorce días de la lesión no anidan en un número significativo en el lecho. Estos autores concluyen en su trabajo que el efecto de las MSCs depende del tiempo post-lesional en que se administran, e incluso dependiendo de este tiempo el efecto que producen es diferente, aunque siempre beneficiosos. Conclusiones similares alcanzan Barbash et al (2003)

Si bien en el presente trabajo no se ha analizado la ubicación de las MSCs, sí hemos observado que la respuesta del receptor es diferente según el tiempo de administración. En los casos que se administraron la MSCs en el periodo inicial del ensayo se observó en el receptor una respuesta inmunológica muy pronunciada, la respuesta se valoró por la presencia abundante de células plasmáticas entre otras; la respuesta del receptor se acompañaba también como se ha comentado por una gran extensión de la placa de crecimiento. Cuando las MSCs se administraron de forma tardía, en nuestro caso a los quince días, la respuesta del lecho es menor en células plasmáticas, aunque similar en cuanto a la expansión de la placa de crecimiento. El porqué de esta respuesta la desconocemos, creemos que puede estar en relación con el comportamiento bimodal de las MSCs en el receptor, citado con anterioridad. Aunque, se ha de tener en cuenta que este aspecto del comportamiento inmunológico no ha sido objeto de estudio del presente trabajo.

Antes de finalizar, es sugerente señalar las limitaciones de este estudio. Una de las limitaciones es que no se ha realizado un estudio de tipificación de las células en subpoblaciones, que quizá daría más información sobre la migración y colonización celular. Estos dos últimos aspectos tampoco se han estudiado. El presente estudio no se diseñó para confirmar o refutar la habilidad de las células transfundidas para diferenciarse en condrocitos.

Futuros estudios de Biología Molecular nos ayudaran a entender el comportamiento de la placa de crecimiento y del diálogo de las moléculas de señalización celular entre las MSCs y la placa de crecimiento. También se requieren estudios experimentales, previos a la aplicación clínica, sobre la tipología de las MSCs, dosificación de la mismas, la heterogeneidad celular, la definición de las subpoblaciones celulares, etc. Se requieren de la misma forma estudios de la corroboración clínica de los resultados, así como estudios de complicaciones y efectos secundarios hasta el momento pocos conocidos o no comunicados. Finalmente, un aspecto importante dado el aumento de la comercialización de las células madre será exigible un mayor control de calidad.

7 Conclusiones

En este trabajo se ha estudiado la contribución de la zona germinativa y zona proliferativa al desarrollo normal de la placa de crecimiento y el efecto de la administración de células madre (MSCs) en el trasplante de placa de crecimiento en rata, y se han extraído las siguientes conclusiones:

1. En la placa de crecimiento, la zona germinativa y la zona proliferativa se estimulan mutuamente. La conjunción funcional de ambas zonas es necesaria para el desarrollo de la placa de crecimiento.
2. La administración de MSCs en trasplante de placa de crecimiento se manifiesta en:
 - a) El estudio radiológico con acortamiento del radio, tendencia a mantener la longitud de la fisis y tendencia a mantener la congruencia articular radiocarpiana, por mayor crecimiento de la epífisis.
 - b) El análisis histológico se manifiesta con tendencia a conservar la arquitectura de la placa de crecimiento, estimulación de la zona germinativa, y exuberancia de células hipertróficas, deficiencia en producir trabéculas óseas primarias.
3. La conservación de la metáfisis ósea no aporta mejoras significativas en el trasplante de placa de crecimiento.

Conclusiones

8 Resumen

TITULO: MEDICINA REGENERATIVA: CÉLULAS MADRE COMO NUEVA TERAPIA BIOLÓGICA APLICADA EN EL TRASPLANTE OSTEOCONDRALE.

En la Medicina Regenerativa, la célula madre, en particular las células troncales mesenquimales (MSCs), son objeto de estudio de su uso terapéutico. Como hipótesis se han planteado las siguientes preguntas: ¿Qué función tiene la zona germinativa en la placa de crecimiento? ¿La administración de rMSCs, repercuten en la función de la placa de crecimiento trasplantada, cómo? ¿Qué aporta la conservación de la metáfisis ósea en el trasplante de placa de crecimiento? Se ha planteado trasplantar placa de crecimiento distal del radio en rata hembra, ortotópico y avascular y tratar los animales con rMSCs. Se han establecido tres grupos: grupo control, trasplante único de placa; grupos tratados con MSCs, i.v. uno con trasplante simple de placa otro con trasplante de placa de crecimiento más metáfisis. Se ha establecido un curso de seguimiento del ensayo de 6, 12 y 24 semanas. Se ha seguido la Directiva (86/609/CEE) y al RD 223/1988. Los resultados se han evaluado mediante estudios de radiología y de histología. Se han obtenido las siguientes conclusiones: En la placa de crecimiento, la zona germinativa estimula a la zona proliferativa. La administración de MSCs repercute en la función de la placa de crecimiento trasplantada estimulando la zona germinativa. La conservación de la metáfisis ósea no aporta mejoras significativas en el trasplante de placa de crecimiento.

9 Bibliografía

- Abad V, Meyers JL, Weise M, Gafni ir, Barnes KM, Nilsson O, Bacher JD, Baron J**, 2002. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* 143, 1851-1857
- Aggarwal S., Pittinger M.F.**, 2005 Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815-1822
- Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wrigth NA**, 2000 Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406, 257
- Alison MR, Murphy G, leedham S**, 2008 Stem cells and cancer: a deadly mix. *Cell Tissue Res* 331, 109-124
- Alsberg E. K.W. Anderson, A. Albeiruti, J.A. Rowley, and D.J. Mooney**, 2002 Engineering growing tissues *PNAS*, 99, 17, 12025-12030
- Alvarez J, Horton J, Sohn P, Serra R**, 2001 The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta1 on endochondral bone formatio. *Developmental Dynamics*, 221, 311-321
- Anderson H.C.** 1995. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop* 314: 266-280
- Andrades J.A., B. Han, J.Becerra, N.Sorgente, F.L. Hall and M.E.Nimni**, 1999 A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Experimental Cell Research* 250, p485-498
- Andreucci JJ, Grant D, Cox DM, Tomc LK, Prywes R, Goldhamer DJ, Rodrigues N, Bédard PA, McDermott JC**, 2002 Composition and function of AP-1transcription complexes during muscle cell differentiation. *J. of Biological Chemistry*, 277, 19, 16426-16432
- Archer C.W., F. Francis-West, P.**, 2003. The Chondrocyte. *International J. of Biochemistry & Cell Biology*, 35, p 401-404
- Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forundi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS** 2003, Effect of stromal-cell-derived factor I on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 362 697-703
- Atti E., S. Gomez, S.M. Wahl. R. Mendelsohn, E. Paschalis and L. Boskey**, 2002 Effects of Transforming growth factor-beta deficiency on bone development: A fourier transform-infrared imaging analysis. *Bone*, vol 31, 675-684
- Attwell S, Mills J, Troussard A, Wu C, Dedhar S.**, 2003. Integration of cell attachment, cytoskeletal localization, and signaling by integrin-linked kinase (ILK), CH-ILKBP, and the tumor suppressor PTEN. *Molecular Biology of the Cell* 14, 4813-4825
- Balleri P, Cozzolino A, Ghelli L, Momicchioli G, Varriale A**, 2002. Stability Measurements of osseointegrated implants using osstell in partially edentulous jaws after 1 year of loading: A pilot study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 4, 128-132
- Ballock R.T. and R.J. O'keefe**, 2003. The Biology of the growth plate (Review). *J. Bone and Joint*

Bibliografia

Surgery, 85-A: 715-726

Ballock, R.T., X. Zhou, L.M. Mink, D.H.C. Chen, B.C. Mita, 2001. Both retinoic acid and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ inhibit thyroid hormone-induced terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *J. of Orthopaedic Research*, 19, 43-49

Banu J, Kalu DN 2004. Site-specific effects of cerivastatin on bone male Sprague-Dawley rats. *Bone* 34, 432-442

Barbash mi, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, Leor J, 2003. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the onfarcted myocardium: feasibility, cell migration and body distribution *Circulation* 108, 863-868

Beck GR, Zerler B, Moran E, 2000 Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 97, 8352-8357

Begum N, Pash JM, Bhorjee JS, 1990 Expression and synthesis of high mobility group chromosomal proteins in different rat skeletal cell lines during myogenesis *J. Biological Chemistry*, 265, 11936-11941

Behraves E., V.I. Sikavitsas, A.G. Mikos, 2004. Quantification of ligand surface concentration of bulk-modified biomimetic hydrogels *Biomaterials*, 24, 4365-4374

Beier F., Z. Ali, D. Mok, A.C. Taylor, T. Leask, C. Albanese, R.G. Pestell and P. LuValle, 2001. TGF beta and PTHrP control chondrocyte proliferation by activating cyclin D1 expression. *Molecular Biology of the Cell*, 12: 3852-3863

Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE, 1990. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitors cells in the presence and absence of dexamethasone and IL-1 α *Dev Biol* 140, 132-138

Bennett VD, Pallante KM, Adams SL, 1991. The splicing pattern of fibronectin mRNA changes during chondrogenesis resulting in an unusual form of the mRNA in cartilage. *J. Biological Chemistry*, 266, 5918-5924

Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, berthio JM, Gourmelon P, Aiqueperse J, 2004, Homing of in vitro expanded Stro-1- or Stro-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and treir role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood* 103, 3313-3319

Bergman RJ, Gazit D, Kahn AJ, Gruber H, McDougall S, Hahn TJ, 1996. Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. *J. Bone Mineral Res.* 11, 568-577

Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J, 2005. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105, 2214-2219

Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. 2001. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordial and premature skeletal mineralization. *PNAS*, 98, 6698-6703

Bi W., J.M. Deng, Z. Zhang, R.R. Behringer, and B. Crombrughe, 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*, 22, 85-89

Boontheekul T., and D.J. Mooney, 2003. Protein-based signaling systems in tissue engineering. *Courrent Opinion in Biotechnology*, 14, 559-565

Bowen C.V., C.P. Ethridge, B. O'Brien, G.K. Frykman, G.J. Gumley, 1988. Experimental

microvascular growth plate transfers. Investigation of vascularity. *J Bone Joint Surg Br* 70: 305-310

Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, Del Toro F, Schwartz Z, 2002. Differential regulation of growth plate chondrocytes by $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ and, $24R,25-(OH)_2D_3$ involves cell-maturation-specific membrane-receptor-activated phospholipid metabolites. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13, 143-154

Boyer M.I., J.S. Danska, L. Nolan, A. Kiral, C.V. Bowen, 1995. Microvascular transplantation of physal allografts. *J Bone Joint Surg Br*, 77: 806-814

Bray P.W., C V Bowen, J.S. Danska and M.I. Boyer, 2003. Development and validation of new model for microvascular transplantation of epiphyseal plate allografts with minimal adjoining epiphyseal and metaphyseal bone. *Microsurgery*, 23, 153-163

Bridgewater LC, Lefebvre V, de Crombrughe B. 1998. Chondrocyte-specific enhancer elements in the *coll1a2* gene resemble the *col2a1* tissue-specific enhancer. *J. Biological Chemistry*, 273, 14998-15006

Brighton C.T., 1984. The growth plate. *Orthop Clin North Am* 15: 571-595

Brighton C.T., 1978. Morphology and biochemistry of the growth plate. *Reumatic Disease Clinics North Am*, 13:75-100

Brighton C.T., R.D. Ray, L.W. Soble, K.E. Kuettner, 1969. In vitro epiphyseal-plate growth in various oxygen tensions. *J Bone Joint Surg Am*, 51: 1383-1396

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth, SE, 1997, Growth kinetics self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation *J Cell Biochem* 64. 278-294

Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S, 1998 The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, 80, 985-996

Brunet L.J., J.A. McMahon, A.P. McMahon, R.M. Harland, 1998. Noggin, Cartilage morphogenesis, and Joint formation in the mammalian skeleton. *Science*, 280, 1455-1457

Burg K.J.L., S. Porter, J.F. Kellam, 2000 Biomaterial developments for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 21: 2347-2359

Burg KJ, Porter S, Kellam JF, 2000. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 21, 2347-2359

Calvi LM, Adams GB, Welbrecht KW, Weber LM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR. Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT, 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425, 841-846

Canicio J, Gallardo E, Illa I, Testar X, Palacin M, Zorzano A, Kaliman P. 1998. p70 S6 kinase activation is not required for insulin-like growth factor-induced differentiation of rat, mouse, or human skeletal muscle cell. *Endocrinology*, 139, 5042-5049

Caplan A.I., 2007. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine *J Cellular Physiology* DOI 10.1002, 341-347.

Caplan AI, Dennis JE, 2006 Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 1;98(5):1076-84

Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM, 1997 Principles of cartilage repair and regeneration *Clin Orthop*, 342, 254-269

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, 1980 Characterization of human bone marrow fibroblast

Bibliografia

colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56, 289-301

Caterson EJ, Nesti LJ, Li WJ, Danielson KG, Albert TJ, Vaccaro AR, Tuan RS, 2001, Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam. *J Biomed Mater Res*, 57, 394-403

Cerri, P.S., E. Sasso-Cerri, 2003. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections. *Micron*, 34, 365-372

Chen, Y.J., T. Wurtz, C.J. Wang, Y.R. kuo, K.D. Yang, H.C. Huang, F.S. Wang, 2004. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J. Orthopaedic Research*, 22(3):526-534

Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL, 1999. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3120-3125

Chimal-Monroy, J. J. Rodriguez-leon, J.A. Mongero, Y. Gañan, D. Macias, R. merino and J.M. Hurle. 2003. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb condrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Developmental Biology*, 257, 292-301

Chung CH, Golup EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM, 1992 Mechanism of action of β -glycerophosphate on bone cell mineralization *Calcified Tissue Int.* 51, 305-311

Ciombor, D.M., G. Iester, R.K. Aaron, P. Neame, B. Caterson, 2002. Low frequency EMF regulates chondrocyte differentiation and expression of matrix proteins. *J. Orthopaedic Research* 20: 40-50

Clancy, B.M., J.D. Johnson, A.J. Lambert, S. Rezvankhah, A. Wong, C. Resmini, J.L. Feldman, S. Leppanen and D.D. Pittman, 2003. A gene expression profile for endochondral bone formation: oligonucleotide microarrays establish novel connections between known genes and BMP-2 induced bone formation in mouse quadriceps. *Bone*, 33, 46-63

Cohen-Salmon M, Frenz D, Liu W, Verpy E, Voegelings S, Petit C, 2000. Fdp a new fibrocyte-derived protein related to MIA/CD-RAP has in vitro effect on the early differentiation of the inner ear mesenchyme. *J. Biological Chemistry*, 275, 40036-40041

Colnot, C.I. , J.A. Helms, 2001. A Molecular analysis of matrix remodeling and angiogenesis during long bone development. *Mechanisms of Development*, 100: 245-250

Colnot, C.I. , J.A. Helms, 2001. Uncoupling of chondrocyte death and vascular invasion in mouse galectin 3 null mutant bones. *Developmental Biology*, 229, 203-214

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ, 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 3213-3218

Compston JE, 2002. Bone marrow and bone: a functional unit. *J. Endocrinology* 173, 387-394

Constam, D.B. and E.J. Robertson, 2000. SPC4/PACE4 regulates a TGFbeta signaling network during axis formation *Genes & Development* 14, 1146-1155

Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ, Florini JR, 1997. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J. Biological Chemistry* 272, 6653-6662

Corbacho AM, Martínez De La Escalera G, Clapp C, 2002. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J. Endocrinology* 173, 219-238

Cordero JB, Cozzolino M, Lu Y, Vidal M, Slatopolsky E, Stahl PD, Barbieri MA, Dusso A, 2002. 1,25-dihydroxyvitamin D down-regulates cell membrane growth and nuclear growth-promoting

signals by the epidermal growth factor receptor. *J. Biological Chemistry*, 277, 38965-38971

Cornish J., K.E. Callon, U. Bava, D.H. Coy, T.B. Mulvey, M.A.F. murray, G.J.S. Cooper, and I.R. Reid, 2001. Systemic administration of adrenomedullin (27-52) increases bone volumen and strength in male mice. *J. Endocrinology*, 170, 251-257

Cotran 1967. The use of colloidal carbon as a tracer for vascular injury. *Vascular Diseases*, 4, 107-109

Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B, 2006. HIF-2 α regulates OCT-4: effects of hypoxia on stem cell funtion, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 20, 557-570

Cozzolino M, Dusso AS, Slatopolsky E, 2001. Role of calcium-phosphate product and bone-associated proteins on vascular calcification in renal failure. *J. the American Society of Nephrology* 12, 2511-2516

Cozzolino M, Lu Y, Finch J, Slatopolsky E, Dusso AS., 2001. p21 WAF1 and TGF- α mediate parathyroid growth arrest by vitamin D and high calcium. *Kidney International*, 60, 2109-2117

Cozzolino M, Stagni V, Spinardi L, Campioni N, Fiorentini C, Salvati E, Alemà S, Salvatore AM, 2003. p120 catenin is required for growth factor-dependent cell motility and scattering in epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell* 14, 1964-1977

Croniger C, Leahy P, Reshef L, Hanson RW, 1998. C/EBP and the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription in the liver. *J. Biological Chemistry* 273, 48, 31629-31632

D'Angelo M., P.C. Billings, M. Pacifici, P.S. Leboy and T. Kirsh, 2001. Authentic Matrix Vesicles Contain Active Metalloproteases (MMP). *J. of Biological Chemistry*, 276, 14, 6: 11437-11353

Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB, 2006, Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues *J. Cell Sci* 119, 2204-2213

Dahle, M., K. Taskén and K.A. Taskén, 2002 USF2 inhibits C/EBP-mediated transcriptional regulation of the RII-beta subunit of cAMP-dependent protein kinase. *BCM Molecular Biology*, 3, 10,

Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biological Chemistry*, 273, 46, 30057-30060

De Luca, F., K.M. Barnes, J.A. Uyeda, S. De-Levi, V. Abad, T. Palese, V. Mericq and J. Baron 2001. Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology*, 142, 1, 430-436

Deleeersnijder W., G. Hong, R. Cortvrindt, C. Poirier, P. Tyzanowski, K. Pittois, E. Van Marck and J. merregaert, 1996. Isolation of markers for chondro-osteogenic differentiation using cDNA library subtraction. *J. Biological Chemistry*, 271, 32, 19475-19482

Delgado E., J.I. Rodriguez, J.L. Rodriguez, A. Serrada, M. Tellez, R. Paniagua, 1985. Radiation induced osteochondroma-like lesion in young rat radius. *Clin orthop*, 201: 251-258

Delgado E., J.I. Rodriguez, J.L. Rodriguez, C. Miralles, R. Paniagua, 1987. Osteochondroma induced by reflection of the perichondral ring in young rat radii. *Calcif Tissue int*, 40: 85-89

Delgado E., M. Gimenez, C. Miralles, A. Nieto, I. Santos, 1991. Morphogenesis on cartilage canals: experimental approach in the rat tibia. *Acta Anat*, 142: 132-137

Delgado E., M. Gimenez, C. Miralles, A. Nieto, I. Santos, 1992. Carililage canal growth: experimental approach in the rat proximal tibial epiphysis. *Acta Anat*, 145: 143-148

Delgado E., M. Gimenez, C. Miralles, A. Nieto, I. Santos, 1992. Growth of the perichondrium and the chondroepiphysis: experimental approach in the rat proximal tibial epiphysis. *Acta Anat*, 145:

Bibliografia

195-200

Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrer K, Mosca J, Deans R, Moseley A, Hoffman R, 2001 Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 29, 244-255

Dietz UH, Sandell LJ, 1996. Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *J. Biological Chemistry*, 271, 3311-6

Doege K, Hall LB, McKinnon W, Chen L, Stephens DT, Garrison K, 2002. A remote upstream element regulates tissue-specific expression of the rat aggrecan gene *J. Biological Chemistry*, 277, 16, 13989-13997

Doherty MJ, Canfield AE, 1999, Gene expression during vascular pericyte differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 9, 1-17

Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM, 2001 Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J Biol Regul Homeost Agents* 15, 28-37

Donohue MM, Demay MB, 2002 Rickets in VDR null mice is secondary to decreased apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Endocrinology* 143 (9):3691-3694.

Dorshkind K 1990 Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol*, 8, 111-137

Drzewiecki, A.E., M.A. Randolph, R.H., Hotchkiss and A.J. Weiland, 1992, Vascularized growth-plate transplantation: a comparative study in the rat. *J. Reconstruct Microsurgery*, 8, 2: 93-100

Dua HS, Azuara-Blanco A 2000 Limbal stem cells of the corneal epithelium *Surv Ophthalmol* 44, 415-425

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G 1997 Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754

Dusso AS, Pavlopoulos T, Naumovich L, Lu Y, Finch J, Brown AJ, Morrissey J, Slatopolsky E, 2001. p21 WAF1 and transforming growth factor- α mediate dietary phosphate regulation of parathyroid cell growth. *Kidney International*, 59, 855-865

Dykstra B, de Haan G, 2008 Hematopoietic stem cell aging and self-renewal. *Cell Tissue Res*. 331(1):91-101.

El-Amin SF, Attawia M, Lu HH, Shah AK, Chang R, Hickok NJ, Tuan RS, Laurencin CT, 2002. Integrin expression by human osteoblasts cultured on degradable polymeric materials applicable for tissue engineered bone. *J. orthopaedic Res* 20, 20-28

Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T, 2000. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J. Biological Chemistry*, 275, 8695-8702

Enomoto-Iwamoto M., H. Enomoto, T. Komori, and M. Iwamoto, 2001. Participation of Cbfa1 in regulation of chondrocyte maturation. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9, A, 76-84

Estrada L.E., G.R. Dodge, D.W. Richardson, A. Farole, and S.A. Jimenez, 2001. Characterization of a biomaterial with cartilage-like properties expressing type X collagen generated in vitro using neonatal porcine articular and growth plate chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 9, 169-177

Farnum C.E., R. Lee, K. O'Hara, and J.P.G. Urban, 2002. Volume increase in growth plate chondrocytes during hypertrophy: The contribution of organic osmolytes. *Bone*, 30, 4, 574-581

- Farquharson C., D. Lester, E. Seawright, D. Jefferies, and B. Houston**, 1999. Microtubules are potential regulators of growth-plate chondrocyte differentiation and hypertrophy. *Bone*, 25, 4, 405-412
- Farquharson, C., D.Jefferies, E.Seawright and B.Houston**, 2001. Regulation of chondrocyte terminal differentiation in the postembryonic growth plate: The role of the PTHrP-Indian Hedgehog Axis. *Endocrinology*, 142, 9, 4131-4140
- Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA**. 2002. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *PNAS*, 99, 11025-11030
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Colleta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F**, 1998. muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 15228-1530
- Fiaschi T, Chiarugi P, Buricchi F, Giannoni E, Taddei ML, Talini D, Cozzi G, Zecchi-Orlandini S, Raugei G, Ramponi G**. 2001. Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase is involved in growth inhibition during cell differentiation. *J. Biological Chemistry*, 276, 9156-9163
- Fischer L, Boland G, Tuan RS**. 2002. Wnt-3A enhances bone morphogenetic protein-2-mediated chondrogenesis of murine C3H10T1/2 mesenchymal cells. *J.Biological Chemistry*, 277, 30870-30878
- Flanders KC, Kim ES, Roberts AB**, 2001. Immunohistochemical expression of smads 1-6 in the 15-day gestation mouse embryo: Signaling by BMPs and TGF-beta. *Developmental Dynamics*, 220, 141-154
- Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Sache A, Bouchet S, Thierry D**, 2006, Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 24, 1020-1029
- Frenz D.A.**,2001. Growth factor control of otic capsule chondrogenesis. *Einstein Quarterly J. Biology and Medicine*, 18: 7-14
- Fridenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV**, 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*, 20, 263-272
- Fridenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV**, 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17, 331-340
- Fridenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN**, 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2, 83-92
- Fridenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN**, 1976 Fibroblasts precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4, 267-274
- Fujita T, Izumo N, Fukuyama R, Meguro T, Nakamuta H, Kohno T, Koida M**, 2001. Phosphate provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 348-352
- Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, O'Driscoll SW**, 2003. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11, 55-64
- Fukunaga, T. T. Yamashiro, S. Oya, N. Takeshita, M. Takigawa and T. Takano-Yamamoto**, 2003. Connective tissue growth factor mRNA expression pattern in cartilages is associated with their typeI collagen expression. *Bone*, 33, 911-918
- Gafni R.I., M. Weisw, D. T. Robrecht, J.L. meyers, K.M. Barnes, S. De-levi, and J. Baron**, 2001.

Bibliografia

Catch-up growth is associated with delayed senescence of the growth plate in rabbits. *Pediatric Research*, 50, 5, 618-623

Gal P., A. Necas, J. Adler, O. Teyschl, P. Fabian, S. Bibrova, 2002. Transplantation of the autogenous chondrocyte graft to physal defects: an experimental study in pigs. *Acta Vet. BRNO*, 71, 327-332

Gavrieli Y., Y. Sherman, and S.A. ben-Sasson, 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biology*, 119, 3, 493-501

Geiser A.G., Q.Q. Zeng, M. Sato, L.M. Helvering, T. Hirano and C.H. Turner, 1998. Decreased bone mass and bone elasticity in mice lacking the transforming growth factor-beta1 gene. *Bone* 23, 87-93

Gelbke, H. 1951, The influence of pressure end tension on growing bone in experiments with animals. *J Bone Joint Surg Am.*;33: 947-954.

Gelse K., S. Söder, W. Eger, T. Diemtar, and T. Aigner, 2003. Osteophyte development molecular characterization of differentiation stages. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11, 141-148

Ghayor C, Chadjichristos C, Herrouin JF, Ala-Kokko L, Suske G, Pujol JP, Galera P, 2001. SP3 Represses the SP1-mediated transactivation of the human COL2A1 gene in primary and differentiated chondrocytes. *J. Biological Chemistry* 276, 36881-36895

Glickman A.M., Hudak P., J.P. Yang and C.V.A. Bowen, 2000. The reliability of a new computerized technique for measuring epiphyseal plate zonal height. *J.Musculoskeletal Research*, 4, 1: 21-29

Goldberg V.M., S. Stevenson S., 1987. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop* 25: 7-6

Gomez-Garcia L., P. Esbrit, L. Carreño, P. Sabando, M. Garcia-Flores and M.E. Martinez, 2003. Alendronate Interacts with the inhibitory effect of 1,25(OH)2D3 on parathyroid hormone-related protein Expression in human osteoblastic cells. *J. Bone and Mineral Research*, 18, 1, 78-88

Goodell MA, 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183, 1797-1806

Gray, A., H. Olsson, I.H. Batty, L.Priganica and P. Downes, 2002. Nonradioactive methods for the assay of phosphoinositide 3-kinases and phosphoinositide phosphatases and selective detection of signalin lipids in cell and tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 313, 234-245

Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunnell B, Ma T, 2006. Effects of Hypoxia an human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J. Cell Physiol*, 207, 331-339

Grimaud, E., D. heymann, F. Redini, 2002. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13, 241-257

Grotendorst GR, 1997, Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-β-action on fibroblasts, *Cytokine Growth Factor Rev*, 8, 171-179

Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ, 1994. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84, 4164-4173

Guo J, Lanske B, Liu BY, Divieti P, Kronenberg HM, Bringham FR, 2001. Signal-selectivity of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor-mediated regulation of differentiation in conditionally immortalized growth-plate chondrocytes. *Endocrinology* 142, 3, 1260-1268

- Haas, S.L.**, 1950. Further observation on the transplantation of the epiphyseal cartilage plate. *Surgery, Gynecology and obstetrics*, 958-963
- Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S, Ahrens W, Joo J, Ahn H, Jurman M, White DW, Rubin CT.** 2002. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair *J. Biological Chemistry*, 277, 30177-30182
- Hall, B.K. and T. Miyake**, 2000. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*, 22, 2, 138-147
- Hanson RW**, 1998. Biological role of the isoforms of C/EBP minireview series. *J. Biological Chemistry*, 273,44, 28543
- Harris R., R. Martin, and M. Tile**, 1965. Transplantation of Epiphyseal plates. *J. Bone and Joint Surgery*, 47-A, 5, 897-914
- Hashizume Y., A. Maruo, G. Sarkar, M.E. Bolander**, 2001. Direct and positive regulation of chondrogenesis by 17beta-estradiol in clonal mouse cell line, ATDC5: possible implication of IRS-1 expression. *Orthopaedic Research Society*, 47th Annual Feb 25-28
- Hatton, J.P., M. Pooran, C.F. li, C. Luzzio and M. Hughes-Fulford**, 2003. A short pulse of mechanical force induce gene expression and growth in MC3T3-E1 osteoblasts via an ERK 1/2 pathway. *J. Bone and Mineral Research*, 18, 1, 58-67
- Haugk, K.L., H.M.P. Wilson, K. Swisshelm and L.S. Quinn**, 2000. Insuline-like growth factor (IGF)-binding protein-related protein-1: An autocrine/paracrine factor that inhibits skeletal myoblast differentiation but permits proliferation in response to IGF. *Endocrinology*, 141, 100-110
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI**, 1996. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitors cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J. Cell Physiol* 166, 585-592
- Haynesworth SE, Goldberg VM, Caplan AI**, 1994. Disminution of the number of mesenchymal stem cells as a cause for skeletal aging. *Buck Walter Ja editors. American Academy of orthopaedic Surgeons* 79-87
- Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P**, 1997, TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471
- Henderson, J.H., and D.R. Carter**, 2002. Mechanical induction in limb morphogenesis: The role of growth-generated strains and pressures. *Bone*, 31, 645-653
- Hiestand P.C.** 1989. Introduction to trasplantation immunology, "Bone Trasplantation" *Springer-Verlog Berlin Heidelberg* 93-97
- Hikake T, Mori T, Iseki K, Hagino S, Zhang Y, Takagi H, Yokoya S, Wanaka A**, 2003. Comparison of expression patterns between CREB family transcription factor OASIS and proteoglycan core protein genes during murine tooth development. *Anatomy and Embriology*, 206, 373-380
- Horton JA, Margulies BS, Strauss JA, Bariteau JT, Damron TA, Spadaro JA, Farnum CE**, 2006. Restoration of growth plate function following radiotherapy is driven by increased proliferative and synthetic activitu of expansions of chondrocytic clones. *J.of Orthop Res.* 24, 1945-1956
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WK, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK**, 1999. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived esenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature* 5, 309-313
- Hu M., K.J: Woodside, R.P. Thomas, T. Meng, C.W. Cooper, L.E. Sower, G.C. Hunter, and J.A.**

Bibliografia

- Daller**, 2002. Altered PTHrP expression during cold storage with Thymoglobulin. *Transplantation proceedings*, 34, 1629-1631
- Huang W, Chung UI, Kronenberg HM, de Crombrughe B**, 2001. The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *PNAS*, 98, 160-165
- Huang W, Lu N, Eberspaecher H, De Crombrughe B**, 2002. A new long form of C-Maf cooperates with Sox9 to activate the type II collagen gene. *J. Biological Chemistry*, 277, 50668-50675
- Huang Z, Cheng SL, Slatopolsky E**, 2001. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is required for extracellular calcium stimulation of human osteoblast proliferation. *J. Biological Chemistry* 276, 21351-21358
- Hunter JG, van Delft MF, Rachubinski RA, Capone JP**. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands differentially modulate muscle cell differentiation and MyoD gene expression via peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent and independent pathways. *J. Biological Chemistry*, 276, 38297-38306
- Huntley, J.S., P.G. Bush, A.C. Hall, M.F. Macnicol**, 2003. Looking at the living human growth plate. *CMAJ (Canadian Medical Association)*, 18, 168, 459-460
- Hunziker E.B., R.K. Schenk, L.M. Cruz-Orive** 1987 Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *J Bone Joint Surg Am*, 69-A: 162-173
- Iannotti J.P.**, 1990. Growth plate physiology and pathology. *Orthop Clin North Am*, 21: 1-17
- Ijiri K., Y.F. Ma, W.S.S. Jee, T. Akamine and X. Liang**, 1995. Adaptation of non-growing former epiphysis and metaphyseal trabecular bones to aging and immobilization in rat. *Bone* 17, 4, 207-212
- Innocenti M., M. Ceruso, M. Manfredini, R. Angeloni, G. Lauri, R. Capanna, C. Bufalini**, 1998. Free vascularized growth plate transfer after bone tumor resection in children. *J Reconstr Microsurg* 14:137-143
- Ishizaki T., M. Naito, K. Fujisawa, M. Maekawa, N. Watanabe, Y. Saito, S. Narumiya**, 1997. p160-ROCK a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Letters* 404, 118-124
- Ito T, Suzuki A, Okabe M, Imai E, Hori M**, 2001. Application of bone marrow-derived stem cells in experimental nephrology. *Exp. Nephrol* 9, 444-450
- Ito Y, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Mello MA, O'Driscoll SW** 2001. Histomorphological and proliferative characterization of developing periosteal neochondrocytes in vitro. *J. Orthopaedic research*, 19, 405-413
- Ito Y., J.S. Fitzsimmons, A. Sanyal, M.A. Mello, N. Mukherjee, and S.W. O'Driscoll**, 2001. Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9, p215-223
- Iwamoto M, Higuchi Y, M. Enomoto-Iwamoto, K. Kurisu, E. Koyama, H. Yeh, J. Rosenbloom, and M. Pacifici**, 2001. The role of ERG (ets related gene) in cartilage development. *Osteoarthritis and Cartilage* 9, 41-47
- Iwasaki S., N. Tsuruoka, A. Hattori, M. Sato, M. Tsujimoto, and M. Kohno**, 1995. Distribution and characterization of specific cellular binding proteins for bone morphogenetic protein-2. *J. Biological Chemistry*, 270, 5476-5482
- Izzo M.W., B. Pucci, R.S. Tuan and D.J. Hall**, 2002. Gene expression profiling following BMP-2 induction of mesenchymal chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage* 10, 23-33

- Jackson KA, Mi T, Goodell MA**, 1999 Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14482-14486
- Jensen L.E., and A.S. Whitehead**, 1996. Regulation of serum amyloid protein expression during the acute-phase response. *Biochemistry J.*, 334, 489-503
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blacktad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC**, 2002, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41-49
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU**, 1998. in vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 238, 265-272
- Kamimura S, Gallieni M, Zhong M, Beron W, Slatopolsky E, Dusso A**, 1995. Microtubules mediate cellular 25-hydroxyvitamin D3 trafficking and genomic response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in normal human monocytes. *J. Biological Chemistry*, vol 270, 22160-22166
- Kang JS, Feinleib JL, Knox S, Ketteringham MA, Krauss RS**, 2003. Promyogenic members of the Ig and cadherin families associate to positively regulate differentiation. *PNAS*, 100, 3989-3994
- Karsenty G. and E. F. Wagner**, 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell*, 2, 389-406
- Karsenty G.**, 2000. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Cell & Developmental Biology*, 11, p 33-346
- Kassem M, Abdallah BM**, 2008. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Res* 331, 157-163
- Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC**, 2005. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 23, 412-423
- Kihara T, oshima A, Hirose M, Ohgushi H**, 2004. Three-dimensional visualization analysis of in vitro cultured bone fabricated by rat marrow mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophysical Res. Communications* 316, 943-948
- Kim HK, Su PH, Qiu YS**, 2001. Histopathologic changes in growth-plate cartilage following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis: An experimental investigation in immature pigs. *J. Bone and Joint Surgery*, 83-A(5), 688-697
- Kim I.S., F. otto, B. Zabel, S. Mundlos**, 1999. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mechanisms of Development*, 80, 159-170
- Kim S.J., H.G. Kim, C.D. Oh, S.G. Hwang, W.K. Song, Y.J. Yoo, S.S. Kang, J.S. Chun**, 2002. p38 kinase-dependent and -independent inhibition of protein kinase C- zeta and alfa regulates nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes. *J. Biological Chemistry*, 277, 33, 30375-30381
- Kindblom JM, Göthe S, Forrest D, Törnell J, Törnell J, Vennström B, Ohlsson C.**, 2001. GH substitution reverses the growth phenotype but not the defective ossification in thyroid hormone receptor alfa 1-/- beta-/- mice. *J. Biological Chemistry*, 171, 15-22
- Ko, J.K., M.J. Lee, S.H. Cho, J.A. Cho, B.Y. Lee, J.S. Koh, S.S. lee, Y.H. Shim, and C.W. Kim**, 2003. Bfl-1S, a novel alternative splice variant of Bfl-1, localizes in the nucleus via its C-terminus and prevents cell death. *Oncogene*, 22, 2457-2465
- Koedam, J.A., J.J. Smink, S.C. Van Buul-Offers**, 2002. Glucocorticoids inhibit vascular endothelial growth factor expression in growth plate chondrocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 197, 35-44

Bibliografia

- Kolbeck S., H. Bail, G. Schmidmaier, M. Alquiza, K. Raun, A. Kappelgard, A. Flyvbjerg, N. Haas, and M. Raschke**, 2003. Homologous growth hormone accelerates bone healing - a biomechanical and histological study. *Bone*, 33, 628-637
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS**, 2007. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Therapy* 9:204, 1-10
- Kondo Y., K. Irie, M. Ikegame, S. Ejiri, K. Hanada and H. Ozawa**, 2001. Role of stromal cells in osteoclast differentiation in bone marrow. *J. Bone and Mineral Metabolism* 19, 352-358
- Kostoulas G, A. Lang, H. Nagase, A. Baici**, 1999. Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Letters* 455 286-290
- Kotton D., R.S. Summer, X. Sun, B. Yang Ma, and A. Fine**, 2003. Stem cell antigen-1 expression in the pulmonary vascular endothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: 990-996
- Krüger A., C. Ellerström, C. Lundmark, C. Christersson and, T. Wurtz**, 2002. RP59, a Marker for Osteoblast Recruitment, is also detected in primitive mesenchymal cells, erythroid cells and megakaryocytes. *Developmental Dynamics* 223, 414-418
- Kubis N, Tomita Y, Tran-Dinh A, Planat-Benard V, André M, Karaszewski B, Waeckel L, Pénicaud L, Silvestre JS, Casteilla L, Seylaz J, Pinard E**, 2007. Vascular fate of adipose tissue-derived adult stromal cells in the ischemic murine brain: A combined imaging-histological study. *Neuroimage*, 34, 1-11
- Kucia M, Wysoczynki M, Ratajczak J, Ratajczak MZ**, 2008. Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Res* 331, 125-134
- Kuhn G, Brüstle O, Martens U, Wobus A, Unsicher K**, 2008. Stem cells: established facts, open issues, and future directions. *Cell Tissue Res*. 331, 1-3
- Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG**, 1997 Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 97, 561-570
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M**, 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med* 6, 1229-1234
- Larraín J, Cizmeci-Smith G, Troncoso V, Stahl RC, Carey DJ, Brandan E**. 1997. Syndecan-1 expression is down-regulated during myoblast terminal differentiation. *J. Biological Chemistry*, 272, 29, 18418-18424
- Lazowski D.A., L.J. Fraher, A. Hodsman, B. Steer, D. Modrowski, V.K. Han**, 1994. Regional variation on insulin-like growth factor-I gene expression in mature rat bone and cartilage. *Bone* 15: 563-576
- Le Blanc K, Ringdén O**, 2007 Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Int Med* 262, 509-525
- Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS**, 2004. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*, 14, 311-324
- Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B**. 2001. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9, 69-75
- Lefebvre V., P. Li, and B. de Crombrughe**, 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO* 17, 5718-5733

- Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG**, 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J. Biological Chemistry*, 273, 28548-22548
- Lezzi S., G. Cossu, C. nervi, V. Sartorelli, and P. L. Puri**, 2002. Stage-specific modulation of skeletal myogenesis by inhibitors of nuclear deacetylases *PNAS*, 99, 7757-7762
- Li G., G.R. Dickson, D.R. Marsh, H. Simpson**, 2003. Rapid new bone tissue remodeling during distraction osteogenesis is associated with apoptosis. *J. Orthopaedic Research*, 21, 28-35
- Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK**, 2002 Elctrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* , 60, 613-621
- Li X, Ionescu AM, Schwarz EM, Zhang X, Drissi H, Puzas JE, Rosier RN, Zuscik MJ, O'Keefe RJ**. 2003. Smad6 is induced by BMP-2 and modulates chondrocyte differentiation. *J. Orthopaedic Research* 21, 908-913
- Lichtman MA**, 1981. The ultrastructure of hematopoietic environment of the marrow: a review. *Exp Hematol* 9, 391-410
- Lin H**, 1997 The tao of stem cells in the germline. *Annu Rev Genet* 31 455-491
- Liu F, Aubin JE, Malaval L**, 2002 Expression of leukemia inhibitory factor (LIF)/interleukin-6 family cytokines and receptors during in vitro osteogenesis: differential regulation by dexamethasone and LIF. *Bone* 31, 212-219
- Liu P, Oyajobi BO, Russell RG, Scutt A**, 1999 Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: interaction between transforming growth factor-beta and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in vitro. *Calcif Tissue Int* 65, 173-180
- Liu Z, Xu J, Colvin JS, Ornitz DM**, 2002. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes & Development* 16, 7, 859-869
- Locker M., O. Kellermann; M. Boucquey, H. Khun, M. Huerre and A. Poliard**, 2004. Paracrine and autocrine signals promoting full chondrogenic differentiation of a mesoblastic cell line. *J. Bone and Mineral Research*, 19, 100-110
- Long F, Schipani E, Asahara H, Kronenberg H, Montminy M**, 2001. The CREB family activators is required for endochondral bone development. *Development* 128, 541-550
- Long PH, Lee SR, Rowland GN, Britton WM** 1984. Experimental rickets in broilers: gross, microscopic and radiographic lesions. II calcium deficiency. *Avian Diseases* 28, 921-932
- Loveridge N., C. Farquharson**, 1993. Studies on growth plate chondrocytes in situ: cell proliferation and differentiation. *Acta Paediatr Suppl*, 391: 42-48
- Lupu F., J.D. Terwilliger, K. lee, G.V. Segre and A. Efstratiadis**, 2001. Roles of growth hormone and insulin-like-growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Developmental Biology* 229, 141-162
- Luvalle P. , Q. Ma, and F. Beier**, 2003. The role of activating Transcription factor-2 in skeletal growth control. *J. Bone and Joint Surgery*, 85, 133-136
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF**, 1998. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4, 415-428.
- Maes C., P. Carmeliet, K. Moermans, I. Stockmans, N. Smets, D. Collen, R. Bouillo, G. Carmeliet**, 2002. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF-164 and VEGF-188. *Mechanisms of Development*, 111, 61-73

Bibliografia

Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF, 1997, Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation *J Orthop Res* 15, 546-557

Majundar MK, Thiede MA, Mosca JD, Mooeman M, Gerson ST, 1998. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cell. *J Cell Physiol* 176, 57-66

Mal A., and M.L. Harter, 2003. MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis. *PNAS*, 100, 1735-1739

Mal A., D. Chattopadhyay, M. K. Ghosh, R.Y.C. Poon, T. Hunter and M.L. Harter, 2000. p21 and retinoblastoma protein control the absence of DNA replication in terminally differentiated muscle cells. *J. Cell Biology*, 149, 281-292

Mal A., M. Sturniolo, R. L. Schiltz, M. K. Ghosh and M. L. Harter, 2001. A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program. *EMBO* 20, 7, 1739-1753

Mansfield K., C.C. Teixeira, C.S. Adams, and I.M. Shapiro, 2001. Phosphate ions mediate chondrocyte apoptosis through a plasma membrane transporter mechanism. *Bone*, 28, 1 1-8

Manso M, S. Ogueta, P. Herrero-Fernandez, L. Vazquez, M. Langlet, J.P. Garcia-Ruiz, 2002. Biological evaluation of aerosol-gel derived hydroxyapatite coating with human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 23, 3985-3990

Martin EA, Ritman EL, Turner RT, 2003. Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. *Bone*, 32, 261-267

Martos A., I. Santos, V. Campo, S. Gonzalez, J.P. Garcia-Ruiz, E. Delgado, 2003. Expression of CCAAT/enhancer-binding protein-beta (C/EBP-beta) and CHOP in the murine growth plate. *J. Bone and Joint Surgery*, June 1190-1195

Massague J, 1998. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-791

Matsui Y, Chansky HA, Barahmand-Pour F, Zielinska-Kwiatkowska A, Tsumaki N, Myoui A, Yoshikawa H, Yang L, Eyre DR 2003. Col11a2 collagen gene transcription is differentially regulated by EWS/ERG sarcoma fusion protein and wild-type ERG. *J. Biological Chemistry*, 278, 11369-11375

Maytin E.V., and J Habener, 1998. Transcription factors C/EBP α , C/EBP β and CHOP (Gadd153) expressed during the differentiation program of keratinocytes in vitro and in vivo. *J. Investigative Dermatology* 110, 238-246

McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN, 2000. Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *PNAS*, 97, 14400-14405

Mehes G., A. Witt, E. Kubista and F. Ambros, 2001. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *American J. Pathology*, 159, 17-20

Mercier N., M. Moldes, K. El Hadri, and B. Fève, 2001. Semicarbazide-sensitive amine oxidase activation promotes adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Biochemical J.* 358, 335-342

Mets T, Verdonk G, 1981. In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mech Ageing Dev* 16, 81-89

Meyers E.N., and G.R. Martin, 1999. Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH. *Science*, 285, 403-406

Miralles C., E. Delgado, 1992. Histomorphometric analysis of the epiphyseal growth plate in rats

after prenatal alcohol exposure. *J Orthop Res* 10:325-336

Miyamoto M. , H. Ito, S. Mukai, T. Kobayashi, H. Yamamoto, M. Kobayashi, T. Maruyama, H. Akiyama, and T. Nakamura, 2003. Simultaneous stimulation of EP2 and EP4 is essential to the effect of prostaglandin E2 in chondrocyte differentiation. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11, 644-652

Mongiati M, Fu J, Oldershaw R, Greenhalgh R, Gown AM, Iozzo RV, 2003. Perlecan protein core interacts with extracellular matrix protein 1 (ECM1), a glycoprotein involved in bone formation and angiogenesis. *J. Biological Chemistry*, 278, 17491-17499

Motoki I. N. Haruhiko, N. ken, N. Takanobu, K. Tomoatsu, O. keiro, 1995. Regulation of Proliferation and Osteochondrogenic Differentiation of Periosteum-Derived Cells by Transforming Growth Factor-Beta and Basic Fibroblast Growth Factor. *J. Bone and Joint Surgery*, 77-A, 543-554

Mukherjee N., D. Saris, S. O'Driscoll, 2001. The enhancement of periosteal chondrogenesis by dynamic fluid pressure. *Orthopaedic Research Society*, 47th Annual Feb 25-28

Murakami S, Kan M, McKeehan WL, de Crombrughe B, 2000. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *PNAS*, 97, 1113-1118

Muramatsu K.; K. Doi, T. Akino, M. Shigetomi, S. Kawai, 1997. Longer survival of rat limb allograft. *Acta Orthop Scand*, 68: 581-585

Murata M., F. Maki, D. Sato, T. Shibata, M. Arisue, 2000. Bone augmentation by onlay implant using recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat skull without periosteum. *Clinical Oral Implants Research*, 11, 289-295

Murray D, Precht P, Balakir R, Horton WE Jr, 2000. The transcription factor deltaEF1 is inversely expressed with type II collagen mRNA and can repress Col2a1 promoter activity in transfected chondrocytes. *J. Biological Chemistry*, 275, 3610-3618

Nakamata T., T. Aoyama, T. Okamoto, T. Hosaka, K. Nishijo, T. Nakayama, T. nakamura, and J. Toguchida, 2003. In vitro demonstration of cell-to-cell interaction in growth plate cartilage using chondrocytes established from p53^{-/-} mice. *J. Bone and Mineral Research*, 18, 97-110

Nathanson MA. 1983. Proteoglycan synthesis by skeletal muscle undergoing bone matrix-directed transformation into cartilage in vitro. *J. Biological Chemistry*, 258, 10325-10334

Nelson WJ, Nusse R, 2004. Convergence of WNT, β -catenin, and cadherin pathways. *Science* , 303, 1483-1487

Neumann C.J., and C. Neusslein-Volhard, 2000. Patterning of the zebrafish retina by a wave of Sonic Hedgehog activity. *Science*, 289, 2137-2139

Newman B, Gigout LI, Sudre L, Grant ME, Wallis GA, 2001. Coordinated expression of matrix Gla protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival. *J. Cell Biology*, 154, 659-666

Nishizawa Y., T. Nakamura, H. Ohata, K. Kushida, I. Gorai, M. Shiraki, M. Fukunaga, T. Hosoi, T. Miki, K. Nakatsuka and M. Miura, 2001. Guideline of the use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis *J. Bone and Mineral Metabolism*, 19, 338-344

Nochi H., J.H. Sung, J. lou, H.D. Adkisson, W. J. maloney, and K.A. Hruska, 2004. Adenovirus mediated BMP-13 gene transfer induces chondrogenic differentiation of murine mesenchymal progenitor cells. *J. Bone and Mineral Research*, 19, 111-122

Ogueta S, Muñoz J, Obregon E, Delgado E, Garcia-Ruiz JP, 2002. Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-

Bibliografia

derived mesenchymal stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 190: 51-63

Oh C.D., S.H. Chang, Y.M. Yoon, S.J. Lee, Y.S. lee, S.S. kang and J.S. Chun, 2000. Opposing role of mitogen-activated protein kinase subtypes Erk-1/2 and p38 in the regulation of chondrogenesis of mesenchymes. *J. Biological Chemistry*, 275, 8, 5613-5619

Ohbayashi N, M.Shibayama, Y.Kurotaki, M.Imanishi, T.Fujimori, N.Itoh and S.Takada, 2002. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes & Development* 16, 870-879

Okamoto T, Aoyama T, Nakayama T, Nakamata T, Hosaka T, Nishijo K, Nakamura T, Kiyono T, Toguchida J, 2002, Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 354-361

Okazaki M., Y. Higuchi and K. Kitamura, 2002. AG-041R stimulates cartilage matrix synthesis without promoting terminal differentiation in rat articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 11, 122-132

Olhsson C., J. Isgaard, J.Törnell, A.Nilsson, O.G. Isaksson, A. Lindahl 1993. Endocrine regulation of longitudinal bone growth. *Acta Paediatr Suppl*, 391: 33-40

Ornatsky OI, Andreucci JJ, McDermott JC. 1997. A Dominant-Negative form of transcription factor MEF2 inhibits myogenesis *J. Biological Chemistry*, 272, 33271-33278

Owen M, 1988. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci* 10, 63-76

Oz OK, Millsaps R, Welch R, Birch J, Zerwekh JE, 2001. Expression of aromatase in the human growth plate. *J. Molecular Endocrinology*, 27, 249-253

Panda DK, Miao D, Lefebvre V, Hendy GN, Goltzman D. 2001. The transcription factor Sox9 regulates cell cycle and differentiation genes in chondrocytic CFK2 cells. *J. Biological Chemistry*, 276, 41229-41236

Park KC, Kim JH, Choi EJ, Min SW, Rhee S, Baek SH, Chung SS, Bang O, Park D, Chiba T, Tanaka K, Chung CH, 2002. Antagonistic regulation of myogenesis by two deubiquitinating enzymes, UBP45 and UBP69. *PNAS*, 99, 9733-9738

Pasquini G.M.F., R.A.M. Davey, P.W.M. Ho, V.P. michelangeli, V. Grill, S.J. Kaczmarczyk and J.D. Zajac, 2002. Local secretion of parathyroid hormone-related protein by osteoblastic osteosarcoma (UMR 106-01) cell line results in growth inhibition. *Bone*, 31, 598-605

Patel SA, Sherman L, Munoz J and Rameshwar P, 2008. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Arch Immunol Ther Exp* 56, 1-8

Pavlov MI, Sautier JM, Oboeuf M, Asselin A, Berdal A, 2003. Chondrogenic differentiation during midfacial development in the mouse: in vivo and in vitro studies. *Biology Cell* 95, 75-86

Pecorino L, 2005 Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics. May, 2005

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284. 1168-1170.

Petersen W, Rafii M, 2001. Immunolocalization of the angiogenetic factor pleiotrophin (PTN) in the growth plate of mice. *Arch OrthopTrauma Surgery* 121, 414-416

Peterson KJ, Cameron RA and Davidson EH, 1997 Set-aside cells in maximal indirect development: evolutionary and developmental significance. cells. *BioEssays* 19, 623-631

Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, van Vliet E, Brankel-van Peer KM, Visser PJ,

1985. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol* 13, 237-243
- Pittinger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman Ma, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR,** 1999 Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147
- Poliard A, Blumen B, Freyria AM, Khun H, Locker M, Huerre M, Kellermann O,** 2001 Chondrogenesis from stem cell recruitment to hypertrophy by a tripotential mesoblastic cell line. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9, 85-90
- Price, JS, B.O. Oyajobi and R.G.G. Russell,** 1993, The cell biology of bone growth, *Eur. J. Clin Nutr*, Feb 48, 134-149
- Prockop DJ,** 1997, Marrow stromal cells as stem cell for non-hematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74
- Pufe T, Bartscher M, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R,** 2003. Pleiotrophin, an embryonic differentiation and growth factor, is expressed in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11, 260-264
- Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, Singh HN, Kraus KH, O'Byrne E, Pellas TC,** 2002. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials* 23, 109-119
- Quintero M., G. Colantuoni, H. Riera, V. Rodriguez, A. Noguera y A. Rosas,** 1997. Factores de crecimiento y citoquinas en la fisiopatología del cartílago articular. II Cartilago patológico. *Archivos de Reumatologia, Hosp. Univ. Los Andes, Merida.*
- Rao MS** 1999 Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *Anat Rec* 257, 137-148.
- Reinecke M, Schmid AC, Heyberger-Meyer B, Hunziker EB, Zapf J,** 2000. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor I(IGF-I) on the expression of IGF-I messenger ribonucleic acid and peptide in rat tibial growth plate and articular chondrocytes in vivo. *Endocrinology* 141, 2847-2853
- Reinholz G.G., L. Lu, D.B.F. Saris, M.J. Yaszemski, S.W. O'Driscoll,** 2004. Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials* 25, 1511-1521
- Renshaw MW, Ren XD, Schwartz MA,** 1997. Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *EMBO* 16, 5592-5599
- Ring P.A.,** 1955. Transplantation of epiphyseal cartilage. An Experimental Study. *J. Bone and Joint Surgery*, 37 642—657
- Risbu MV, Sittiger M,** 2002. Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation. *TREND in Biotechnology* 20, 351-356
- Ritter S.J., and P.J.A. Davies,** 1998. Identification of a Transforming Growth Factor-beta1/Bone Morphogenetic Protein 4 (TGF-beta1/BMP4) response element within the mouse tissue Transglutaminase Gene Promoter. *J. Biological Chemistry*, 273, : 12798-12806
- Roach H.I., G. Mehta, R.O.C. Oreffo, N.M.P. Clarke, and C. Cooper,** 2003. Temporal analysis of rat growth plates: cessation of growth with age despite presence of a physis. *J. Histochemistry & Cytochemistry*, 51, 373-383
- Roach H.I., J. Erenpreisa and T. Aigner,** 1995. Osteogenic differentiation of hypertrophic

Bibliografía

chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J. Cell Biology*, 131, 483-494

Robling A.G., K.M. Duijvelaar, J.V. geervers, N. Ohashi, and C.H. Turner, 2001. Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. *Bone*, 29, 105-113

Robson, H. T.Siebler, D.A. Stevens, S.M. Shalet and G.R. Williams, 2000. Thyroid Hormone Act directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology* 141, 3887-3897

Romero-Prado M, Blázquez C, Rodríguez-Navas C, Muñoz J, Guerrero I, Delgado-Baeza E, García-Ruiz JP. 2006, Functional characterization of human mesenchymal stem cells that maintain osteochondral fates. *J Cell Biochem. Aug 15;98(6):1457-70*

Rose FR, Oreffo RO, 2002. Bone tissue engineering : hope vs hype *Biochem Biophys Res Commun* 292, 1-7

Rosen E.D., C.J. Walkey, P. Puigserver, and B.M. Spiegelman, 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Development* 14, 1293-1307

Rudnicki JA, Brown AM, 1997. Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression in vivo and in vitro *Dev. Biol* 185, 104-118

Sabbagh Y, Carpenter TO, Demay MB, 2005 Hypophosphatemia leads to rickets by impairing caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *PNAS*, 102, 9637-9642

Sahai E., and C. J. Marshall, 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/Rock signalling and extracellular proteolysis. *Nature Cell Biology* 5, 711 - 719

Sahni M, Raz R, Coffin JD, Levy D, Basilico C, 2001. STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development* 128, 2119-2129

Sahni M., D.C. Ambrosetti, A. Mansukhani, R. Gertner, D. levy, and C. Basilico, 1999. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes & Development* 1361-1366

Sanchez M., G. Pontarelli, L. peluso, G. Giuliano, D. Terracciano, E. Gionti, 2001. $\alpha 1(I)$ collagen gene expression in quail epiphyseal chondrocytes. *Biochimie* 83, 537-543

Santa Maria L, Rojas CV, Minguell JJ, 2004. Signals from damaged but not undamaged skeletal muscle induce myogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 300, 418-426

Santos I., A. martos, E. Delgado, 2003. Embryonic blastemic changes in retinoic acid-induced hindlimb deformity. *Cell Tissues Organs* 173: 217-226

Sartorelli V., P.L. Puri, Y. Hamamori, V. Ogryzko, G. Chung, Y. Nakatani, J.Y.j. Wang, and L. Kedes, 1999. Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Molecular cell*, 4, 725-734

Sass D.A., A.R. Bowman, Z.Yuan, Y. Ma, W.S.S. Jee, and S. Epstein, 1997. Alendronate prevents cyclosporin-A induced osteopenia in the rat. *Bone* 21, 65-70

Schaefer JF, Millham ML, de Crombrughe B, Buckbinder L., 2003. FGF signaling antagonizes cytokine-mediated repression of Sox9 in SW1353 chondrosarcoma cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11, 233-241

Schenk S., Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z, McCarthy PM, and Penn MS, 2007. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem*

cells 25, 245-251.

Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS, 2001. Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes & Development* 15, 2865-2876

Schofield R, 1978, The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25

Seifert M.F., 1996. Abnormalities in bone cell function and endochondral ossification in the osteopetrotic toothless rat. *Bone*, 19, 329-338

Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M, 2000. Sox9 Enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J. Biological Chemistry*, 275, 10738-10744

Sekiya I, J.T. Vuoristo, B.L. larson, and D.J. Prockop, 2002. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma define the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *PNAS* 99, 4397-4402

Shapiro F, Holtrop ME, Glimacher MJ, 1977 Organization and cellular biology of the perichondrial ossification groove of ranvier. *J. Bone and Joint Surg* 59-A 703-723

Shen M, Yoshida E, Yan W, Kawamoto T, Suardita K, Koyano Y, Fujimoto K, Noshiro M, Kato Y, 2002. Basic Helix-loop-helix protein DEC1 promotes chondrocyte differentiation at the early and terminal stages. *J. of Biological Chemistry*, 277, 50112-50120

Shi S, Gronthos S, 2003. perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 18, 696-704

Shida J. , S Jingushi, T. Izumi, T. Ikenoue, Y. Iwamoto, 2001. Basic fibroblas growth factor regulates expression of growth factors in rat epiphyseal chondrocytes. *J. Orthopaedic Research*, 19, 259-264

Shiga M, Kapila YL, Zhang Q, Hayami T, Kapila S, 2003. Ascorbic acid induces collagenase-1 in human periodontal ligament cells but not in MC3T3-E1 osteoblast-like cells: Potential association betwenn collagenase expression and changes in alkaline phosphatase phenotype. *J. Bone Mineral Research*, 18, 67-77

Shigetomi M., S. Kawai, T. Fukumoto, 1993. Studies of allotransplantation of bone using immunohistochemistry and radioimmunoassay in rats. *Clin Orthop*, 292: 345-352

Shigeyuki W., G. Tatsuhiko, P. J. Stephen, Y. G. Randell, J.M. mansour, A.I. caplan, V.M. Goldberg, 1994. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone and Joint Surgery*, 76-A(4),579-592

Shimizu A., K. Tada, C. Shukunami, Y. Hiraki, T. Kurokawa, N. Magane and M. Kurokawa-Seo, 2001. A novel alternatively spliced fibroblast growth factor receptor 3 isoform lacking the acid box domain is expressed during chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J. Biological Chemistry*, 276, 11031-11040

Shin H., K. Zygorakis, M.C.Farach-Carson, M.J. Yaszemski, A. G. Mikos, 2004. Attachment, proliferation, and migration of marrow stromal osteoblasts cultured on biomimetic hydrogels modified with an osteopontin-derived peptide. *Biomaterials* 25, 895-906

Siebler T, Robson H, Bromley M, Stevens DA, Shalet SM, Williams GR., 2002. Thyroid status affects number and localization of thyroid hormone receptor expressing mast cells in bone marrow. *Bone* 30, 259-266

Bibliografia

- Siebler T, Robson H, Shalet SM, Williams GR.,** 2002. Dexamethasone inhibits and thyroid hormone promotes differentiation of mouse chondrogenic ATDC5 cells. *Bone*, 31, 457-464
- Siffert R.S.,** 1966. The growth plate and its affections. *J Bone Joint Surg Am* 48-A: 546-563
- Sikavitsas V.I., J.S. Temenoff, A.G. Mikos,** 2001. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 22, 2581-2593
- Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino A, Ohta S, Graves S,** 1994. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res* 389, 271-280
- Siow NL, Choi RC, Cheng AW, Jiang JX, Wan DC, Zhu SQ, Tsim KW.,** 2002. A cyclic AMP-dependent pathway regulates the expression of acetylcholinesterase during myogenic differentiation of C2C12 cells. *J. Biological Chemistry*, 277, 36129-36136
- Sironen R.K., H.M. Karjalainen, M.A. Elo, K. Kaarniranta, K. Törrönen, M. Takigawa, H.J. Helminen, M.J. Lammi,** 2002. cDNA array reveals mechanosensitive genes in chondrocytic cell under hydrostatic pressure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1591, 45-54
- Skliris G.P., A.T. Parkes, J.L. Limer, S.E. Burdall, P.J. Carder, and V. Speirs,** 2002. Evaluation of seven oestrogen receptor beta antibodies for immunohistochemistry, western blotting, and flow cytometry in human breast tissue. *J. Pathology* 197, 155-162
- Slatopolsky E, Cozzolino M, Lu Y, Finch J, Dusso A, Staniforth M, Wein Y, Webster J,** 2003. Efficacy of 19-nor-1,25-(OH)₂D₂ in the prevention and treatment of hyperparathyroid bone disease in experimental uremia. *Kidney International*, 63, 2020-2027
- Slatopolsky E, Finch J, Clay P, Martin D, Sicard G, Singer G, Gao P, Cantor T, Dusso A,** 2000. A novel mechanism for skeletal resistance in uremia. *Kidney International*, 58, 753-761
- Smith K., and R.A. Schneider,** 1998. Have gene knockouts caused evolutionary reversals in the mammalian first arch? *BioEssays*, 20.3, 245-255
- Somjen D, Waisman A, Lee JK, Posner GH, Kaye AM,** 2001. A non-calcemic analog of 1 α ,25 dihydroxy vitamin D₃ (JkF) upregulates the induction of creatin kinase B by 17 β estradiol in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells and in rat diaphysis. *J. Steroid Biochem Mol Biology*, 77, 205-212
- Somlyo A.V., C. Phelps, C. Dipierro, M. esto, P. read, M. Barrett, J.J. Gibson, M.C. Burnitz, C. Myers, and A.P. Somlyo,** 2003. Rho kinase and matrix metalloproteinase inhibitors cooperate to inhibit angiogenesis and growth of human prostate cancer xenotransplants. *FASEB* 17, 223-234
- Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A,** 2006. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* 24, 1254-1264
- Sousa V.L., C. Brito, T. Costa, J. Ianoix, T. Nilsson and J. Costa,** 2003. Importance of Cys, Gln, and Tyr from the transmembrane domain of human α 3/4 fucosyltransferase III for its localization and sorting in the golgi of baby hamster kidney cells. *J. Biological Chemistry* 278, 7624-7629
- Spagnoli A, Hwa V, Horton WA, Lunstrum GP, Roberts CT Jr, Chiarelli F, Torello M, Rosenfeld RG,** 2001. Antiproliferative effects of insulin-like growth factor-binding protein-3 in mesenchymal chondrogenic cell line RCJ3.1C5.18. *J. Biological Chemistry*, 276, 5533-5540
- Spagnoli A., M. Torello, S.R. Nagalla, W.A. Horton, P. Pattee, V. Hwa, F. Chiarelli, C.T. Roberts, and R.G. Rosenfeld,** 2002. Identification of STAT-1 as a molecular target of IGFBP-3 in the process of chondrogenesis. *J. Biological Chemistry*, 277, 18860-18867

- Stevens D.A., G.R. Williams**, 1999. Hormone regulation of chondrocyte differentiation and endochondral bone formation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 151, 195-204
- Stevens D.A., M.I. Boyer, V.A. Bowen** 1999. Transplantation of epiphyseal plate allografts between animals of different ages. *J Pediatric Orthop*, 19: 398-403
- Stevens D.A., V.A. Bowen**, 1995. Heterotopic microvascular epiphyseal plate trnasplantation: a new model using the rabbit metatarsal. *Microsurgery*, 16: 488-492
- Suardita K, Fujimoto K, Oda R, Shimazu A, Miyazaki K, Kawamoto T, Kato Y.**, 2002. Effects of overexpression of membrane-bound transferrin-like protein (MTf) on chondrogenic differentiation in vitro. *J.Biological Chemistry*, 277, 48579-48586
- Suda T, Arai F, Hirao A**, 2005. Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends in Immunol* 26, 426-433
- Svensson O, Hjerpe A, Reinholt FP, Engfeldt B**, 1985, The effect of manganese ingestion, phosphate depletion and starvation on the morphology of the epiphyseal growth plate. *Clin Orthop Rel Res* 197, 286-294
- Sylvia VL, Del Toro F Jr, Hardin RR, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z.**, 2001. Characterization of PGE2 receptors (EP) and their role as mediators of 1alfa,25-(OH)2D3 effects on growth zone chondrocytes. *J. Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 78, 261-274
- Takahashi M, Wehrli FW, Hilaire L, Zemel BS, Hwang SN**, 2002. In vivo NMR microscopy allows short-term serial assessment of multiple skeletal implications of corticosteroid exposure. *PNAS*, 99, 4574-4579
- Takeda S, J.P. Bonnamy, M.J. Owen, P. Ducy and G. Kaesenty**, 2001. Continous expresion of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes & Development* 15, 467-475
- Tavare J.M., L.M. Fletcher, and G.I. Welsh**, 2001. Using green fluorescent protein to study intracellular signalling. *J. Endocrinology* 170, 297-306
- Taylor GS, Maehama T, Dixon JE**, 2000. Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *PNAS*, 97, 8910-8915
- Teixeira CC, Mansfield K, Hertkorn C, Ischiropoulos H, Shapiro IM.**, 2001. Phosphate-induced chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation *American J. Physiological Cell*, 281, 833-839
- Tenenbaum HC, Limeback H, McCulloch CA, Mamujee H, Sukhu B, Torontali M**, 1992. Osteogenic phase-specific co-regulation of collagen synthesis and mineralization by beta-glycerophosphate in chick periosteal cultures *Bone* 13, 129-138
- Terry D.E., R.K. Chopra, J. Orenden, and T.P. Anastassiades**, 2000. Differential use of alcian blue and toluidine blue dyes for the quantification and isolation of anionic glycoconjugates from cell cultures: Application to proteoglycans and a high-molecular-weigth glycoprotein synthesisez by articular chondrocytes. *Analytical Biochemistry* 285, 211-219
- Tiffée J.C., J.P. griffin, L.F. Cooper**, 2000. Immunolocalization of stress proteins and extracellular matrix proteins in the rat tibia. *Tissue & Cell* 32(2) 141-147
- Tomita M, Reinhold MI, Molkentin JD, Naski MC**, 2002. Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis. *J. Biological Chemistry*, 277, 42214-42218
- Toshimi A., K. Shoichi, T. Yasuhisa**, 1997. Apoptosis and Proliferation of growth plate chondrocytes

Bibliografía

in rabbits. *J. Bone and Joint Surgery (Br)* 79-B(3).483-486

Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, manske P, Lou J, 2003. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J. Orthopaedic Res.* 21, 44-53

Tuan RS, Boland G, and Tuli R, 2002 Adult mesenchymal stem cell and cell-based tissue engineering *Arthritis Research and Therapy* 5, 32-45

Tufan AC, Tuan RS, 2001 Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions *FASEB J* 15, 1436-1438

Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, Danielson KG, HallDJ, Tuan RS, 2003, transforming growth factor- β -mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J. Biol Chem* 278, 41227-41236

Ueno T., T. Kagawa, M. Kanou, T. Fijii, J. Fukunaga, N. Mizukawa, T. Sugahara, T. Yamamoto, 2003. Immunohistochemical observations of cellular differentiation and proliferation in endochondral bone formation from grafted periosteum: expression and localization of BMP-2 and -4 in the grafted periosteum. *J. Cranio-Maxillofacial Surgery*, 31 356-361

Ueno T., T. Kagawa, N. Mizukawa, H. Nakamura, T. Sugahara, and T. Yamamoto, 2001. Cellular origin of endochondral ossification from grafted periosteum. *Anatomical Record*, 264, 348-357

Van Der Eerden B.C.J., E.F. Gevers, C.W.G.M. Löwik, M. Karperien and J.M. Wit, 2002. Expression of Estrogen Receptor α γ β in the Epiphyseal Plate of the Rat. *Bone*, 30, 478-485

Vidal N.O.A., S. Ekberg, S. Enerbäck, A. Lindahl, and C. Ohlsson, 1997. The CCAAT/enhancer-binding protein α is expressed in the germinal layer of the growth plate: colocalisation with the growth hormone receptor. *J. Endocrinology*, 155, 433-441

Wagner, E. F., and G. Karsenty, 2001. Genetic control of skeletal development. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 527-532

Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM, 1994 Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg Am* 76, 579-592

Wakitani S, Yamamoto T, 2002. Response of the donor and recipient cells in mesenchymal cell transplantation to cartilage defect. *Microsc. Res. Tech.* 58, 14-18

Waldmann TA, O'Shea J, 1998 The use of antibodies against the IL-2 receptor in transplantation. *Current Opinion in Immunology*, 10, 507-512

Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo Gr, Terstappen L, 1995, The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* 85, 2422-2435

Wang D., L. Canaff, D. Davidson, A. Corluka, H. Liu; G.N. Hendy, and J.E. Henderson, 2001. Alterations in the sensing and transport of phosphate and calcium by differentiating chondrocytes. *J. of Biological Chemistry*, 276, 33995-34005

Wang L, Ma X, Yeh LC, Adamo ML, 2001. Differential regulation of IGF-binding protein gene expression by cAMP in rat C6 glioma cells. *Endocrinology*, 142, 3917-3925

Wang L, G. Verbruggen, K.F. Almquist, D. Elewaut, C. Broddelez, and E.M. Veys, 2001. Flow cytometric analysis of the human articular chondrocyte phenotype in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage* 9, 73-84

- Wang Q, Green RP, Zhao G, Ornitz DM**, 2001. Differential regulation of endochondral bone growth and joint development by FGFR1 and FGFR3 tyrosine kinase domains. *Development*, 128, 3867-3876
- Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J**. 2001. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *PNAS*, 98, 6871-6876
- White A., and G. Wallis**, 2002. Endochondral ossification: A delicate balance between growth and mineralisation. *Current Biology*, 11, R589-R591
- Wilkins BS, Jones DB**, 1995 Immunohistochemical characterization of intact stromal layers in long-term cultures of human bone marrow. *Br. J Haematol* 90, 757-766
- Winter B, Braun T, Arnold HH**, 1993. cAMP-dependent protein kinase represses myogenic differentiation and the activity of the muscle-specific helix-loop-helix transcription factors Myf-5 and MyoD. *J. Biological Chemistry*, 268, 9869-9878
- Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G**, 2001. Thyroid hormone action in mitochondria. *J. Molecular Endocrinology* 26, 67-77
- Wurtz T., A. krüger, C. Christersson, and C. Lundmark**, 2001. A new protein expressed in bone marrow cells and osteoblasts with implication in osteoblast recruitment. *Experimental Cell Research* 263, 236-242
- Wynter EA, Emmerson AJ, Testa NG**, 1999 Properties of peripheral blood and cord blood stem cells. *Baillière's Best Pract Res Clin Haematol* 12, 1-17
- Xie WF, Kondo S, Sandell LJ**, 1998. Regulation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by the transcription factor AP-2. *J. Biological Chemistry*, 273, 5026-5032
- Yamashiro T., T. Fukunaga, K. Yamashita, N. Kobashi and T. Takano-Yamamoto**, 2001. Gene and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in bone and cartilage. *Bone*, 28, 404-409
- Yanai T., T. Katagiri, S. Akiyama, M. imada, T. Yamashita, H. Chiba, N. Takahashi, and T. Suda**, 2001. Expression of mouse osteocalcin transcripts, OG1 and OG2, is differently regulated in bone tissues and osteoblast cultures. *J. Bone and Mineral Metabolism* 19, 345-351
- Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng CX**, 2001. TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J. Cell Biology*, 153, 35-46
- Yang X., R. S. Tare, K.A. Partridge, H. Roach, N.M.P. Clarke, S.M. Howdle, K.M. Shakesheff, and R.O.C. Oreffo**, 2003. Induction of human osteoprogenitor chemotaxis proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating Factor-1/Pleiotrophin: Osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering. *J. Bone and Mineral Research*, 18, 47-60
- Yaremchuk M.J., H. Nettelblad, M.A. Randolph, and A.J. Weiland**, 1985. Vascularized bone allograft transplantation in a genetically defined rat model. *Plastic Reconstructive Surgery*, 75, 355-362
- Yaszemski M.J., R.G. Payne, W.C. Hayes, R. Langer, and A. G. Mikos**, 1996. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials*, 17, 175-185
- Yin T, Li L**, 2006. The stem cell niches in bone. *J. Clin. Investigation* 116, 1195-1201
- Yoon YM, Kim SJ, Oh CD, Ju JW, Song WK, Yoo YJ, Huh TL, Chun JS**, 2002. Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase. *J. Biological Chemistry*, 277, 8412-8420

Bibliografia

- Yoon YM, Oh CD, Kim DY, Lee YS, Park JW, Huh TL, Kang SS, Chun JS**, 2000. Epidermal growth factor negatively regulates chondrogenesis of mesenchymal cells by modulating the protein kinase C- α , Erk-1 and p38 MAPK signaling pathways. *J. Biological Chemistry*, 275, 12353-12359
- Zelzer E, Glotzer DJ, Hartmann C, Thomas D, Fukai N, Soker S, Olsen BR**, 2001. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/ Runx2. *Mechanisms of Development*, 106, 97-106
- Zeng L, Kempf H, Murtaugh LC, Sato ME, Lassar AB**, 2002. Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis. *Genes & Development* 16, 1990-2005
- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Rosss J, Haug J, Johnson T, Fenf JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, li L**, 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* , 425, 836-841
- Zhang Y., L. Cao, B.L. Yang, and B.B. Yang**, 1998. The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. *J. Biological Chemistry*, 273, 21342-21351
- Zhu J, Emerson SG**, 2004 A new bone to pick: osteoblasts and the haematopoietic stem-cell niche. *BioEssays* 26, 595-599
- Zuk P.A., M. Zhu, P. Ashjian, D.A.De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim and M.H. Hedrick**, 2002. Human adipose Tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279-4295
- Zuscik M.J., M. D'Souza, K.K. Gunter, T.E. Gunter, R.J. O'Keefe, E.M. Schwarz, J.E. Puzas, and R.N. Rosier**, 2002. Growth plate chondrocyte maturation is regulated by basal intracellular calcium. *Experimental Cell Research* 276, 310-319